



Universitat de Girona

L'EMMAGATZEMATGE INTRAOVÀRIC D'ESPERMA EN HELICOLENUS DACTYLOPTERUS DACTYLOPTERUS (PISCES: SCORPAENIFORMES)

Sílvia VILA ESPUÑA

ISBN: 978-84-693-7991-2

Dipòsit legal: GI-I228-2010

<http://www.tdx.cat/TDX-100110-105053>

ADVERTIMENT. La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX (www.tesisenxarxa.net) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

ADVERTENCIA. La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR (www.tesisenred.net) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

WARNING. On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX (www.tesisenxarxa.net) service has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized neither its spreading and availability from a site foreign to the TDX service. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service is not authorized (framing). This rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.



Tesi Doctoral

L'emmagatzematge intraovàric d'esperma en *Helicolenus dactylopterus dactylopterus* (Pisces: Scorpaeniformes)

Sílvia Vila Espuña

2010

Programa de Doctorat: Ciències Experimentals i Sostenibilitat

Direcció : Dra. Marta Muñoz Frigola

Memòria presentada per optar al títol de Doctora per la
Universitat de Girona.



Marta Muñoz Frigola, professora titular del Departament de Ciències Ambientals de la Universitat de Girona,

CERTIFICO:

Que aquest treball titulat "L'emmagatzematge intraovàric d'esperma en *Helicolenus dactylopterus dactylopterus* (Pisces: Scorpaeniformes)", que presenta Sílvia Vila Espuña per a l'obtenció del títol de Doctora, ha estat realitzat sota la meva direcció.

Marta Muñoz Frigola

Girona, 14 d'octubre de 2009

...a la meva família
i a la Marta

AGRAÏMENTS

No m'ho puc creure! Estic escrivint els agraïments de la meva tesi doctoral.....i hi ha tantes persones a les que vull donar les gràcies que no sé com començar....

El primer i més sincer agraïment el dedico a la Marta Muñoz, la meva directora de tesi, que durant aquests anys ha estat molt més que la meva directora. Ella ha estat la meva consellera, m'ha animat en aquelles èpoques en les que jo no veia la llum (els que heu fet una tesi m'entendreu perfectament), sempre m'ha encoratjat a tirar endavant i, més que res, al llarg d'aquesta etapa ella ha estat la meva amiga.

Sens dubte també agraeixo el suport i comprensió que sempre m'ha donat la Margarita, que fos en el moment que fos sempre ha tingut un moment per ajudar-me o aconsellar-me. N'estic segura que sense elles no ho hauria aconseguit.

També estic molt agraïda a la Maria i la M^aRosa, elles van recomanar-me a quins ports era millor que anés a buscar les mostres de penegal, em van posar en contacte amb diversos pescadors, també van orientar-me en el treball histològic del laboratori quan començava el meu treball (tincions, talls, inclusions en GMA,).

Un espai en aquest apartat l'haig de dedicar als pescadors dels ports de Roses, Palamós, Llançà,...que m'han aconseguit penegals durant anys, i fins i tot me'ls han guardat vius en bidons plens d'aigua per les mostres destinades al microscopi electrònic. I tot això sempre amb un somriure als llavis.

No puc oblidar en aquest apartat a la Gemma Vila i la Sílvia Terradas, que sempre que calia demanar qualsevol producte, instrument, bibliografia,...o ajudar-me a escanejar diapositives, fotos....mai hi posaven cap problema.

També haig de donar les gràcies a la Carme, en Dani i en Jordi del Servei de Microscopia, per ensenyar-me el funcionament de tots els aparells necessaris per processar i observar les mostres del microscopi electrònic.

I com no, a en David Caselles, Pitu, Pere, Sílvia, Crisanto, David Estany, Eulàlia, Caterina, Josep Lloret,i a tots els altres companys de l'Àrea de Biologia Animal, per l'ajuda que m'han donat quan ho he necessitat o simplement pel bon ambient de treball en el que he pogut treballar tots aquests anys.

Al dr. Yasunori Koya i el seu equip, per acollir-me a la seva Universitat, per la seva hospitalitat i per ensenyar-me diversos protocols que després m'han estat molt útils en aquest treball.

També al dr. Leonel Serrano-Gordo, la Vera Sequeira i a tot el seu grup d'investigadors per permetre'm fer una estada i ampliar els meus coneixements sobre biologia d'embrions en el seu laboratori i amb el grup d'embriologia de la Universitat de Lisboa.

A les meves nenes: Bibi, Carme, Roser, Gemma, Dolors, Yose, Sílvia,... les meves ànimes bessones, que m'han ensenyat què és la vertadera amistat i amb les que he compartit alguns dels millors períodes de la meva vida. Elles m'han ajudat a desconnectar de les meves cabòries i a saber gaudir dels petits moments.

I finalment haig de donar les gràcies als meus pares que m'han donat l'oportunitat d'estudiar el que realment m'agrada i m'han ensenyat a no llençar mai la tovallola i lluitar amb totes les forces pel que un desitja. Segurament les excursions al bosc que fèiem amb el meus pares o els meus avis quan jo encara era una nena, l'anar a buscar cargols, bolets, espàrrecs o castanyes amb ells va ser el que em va ensenyar a estimar la natura i em va despertar la curiositat per conèixer, curiositat que amb els anys s'ha convertit en esperit investigador. No cal dir que tant els meus pares com l'Àngel, en David i els meus avis la Pilar i en Narcís i la meva besàvia Margarita, han sabut encoratjar-me, fer-me riure quan jo estava en moments baixos, han escoltat estoicament les meves cabòries, suposicions i hipòtesis sobre els meus experiments,

sempre intentant mostrar un gran interès.... Sóc plenament conscient de que mai podré agrair-los prou el que han fet per mi.

A tots i de tot cor.....MOLTES GRÀCIES.

PUBLICACIONS DERIVADES DE LA TESI DOCTORAL:

- Intraovarian sperm storage in *Helicolenus dactylopterus dactylopterus* : Fertilization, crypt formation and maintenance of stored sperm. 2007. **Vila, S.**; Sàbat, M.; Hernández, M.R ; Muñoz, M. *The Raffles Bulletin of Zoology*, **14**:21-27.
- Annual cycle of stored spermatozoa within the ovaries of *Helicolenus dactylopterus dactylopterus* (Teleostei, Scorpaenidae). 2007. **Vila, S.**; Muñoz, M.; Sàbat, M.; Casadevall, M. *Journal of Fish Biology*, **71**:596-609.
- Spermiogenesis particularities of a sperm storage species: *Helicolenus dactylopterus* (Teleostei: Scorpaenidae). **Vila, S.**; Sàbat, M.; Muñoz, M.; Casadevall, M. (en revisió, *Scientia Marina*).

0. ÍNDEX

0. ÍNDEX

Agraïments

Resum tesi ----- 3

1. Introducció general

1.1. Introducció ----- 9

1.2. Antecedents ----- 11

1.2.1. Antecedents generals de l'espècie ----- 11

1.2.2. Antecedents sobre la biologia reproductiva de l'espècie ----- 17

1.3. Objectius del treball ----- 20

2. Material i Mètodes

2.1. Material recol·lectat ----- 23

2.2. Mètodes ----- 24

3. Resultats i discussió

3.1. Mascles: Estructura testicular, espermatogènesi i cicle anual

3.1.1. Resultats

3.1.1.1. Estructura testicular ----- 53

3.1.1.2. Espermatogènesi ----- 56

3.1.1.3. Cicle anual ----- 61

3.1.1.4. Làmines de mascles ----- 68

3.1.2. Discussió ----- 93

3.2. Femelles: Estructura ovàrica, emmagatzematge
d'espermatozoides i cicle anual

3.2.1. Resultats

3.2.1.1. Estructura ovàrica ----- 105

3.2.1.2. Emmagatzematge d'espermatozoides ----- 106

3.2.1.3. Cicle anual ----- 107

3.2.1.4. Làmines de femelles ----- 118

3.2.2. Discussió ----- 147

3.3. Fertilització, desenvolupament embrionari i posta

3.3.1. Resultats

3.3.1.1. Estadis de desenvolupament embrionari ----- 157

3.3.1.2. Làmines d'embrions ----- 162

3.3.2. Discussió -----	175
4. Discussió general -----	185
5. Conclusions -----	207
6. Bibliografia -----	211
7. Annex -----	243

RESUM DE LA TESI DOCTORAL:

Català:

El penegal, *Helicolenus dactylopterus dactylopterus* (Pisces: Scorpaeniformes), és una espècie que habita profunditats d'entre els 200 i 1000 m i presenta una clara distribució batimètrica en funció de la seva talla.

Les seves peculiars característiques reproductives la fan molt interessant des del punt de vista de la biologia de la reproducció. Presenta fecundació interna i a l'interior de l'ovari conté estructures d'emmagatzematge que permeten emmagatzemar l'esperma durant períodes de temps considerablement llargs. Les cèl·lules sexuals masculines es mantenen viables gràcies a diverses substàncies nutritives que obtenen de la bossa citoplasmàtica i de l'epiteli criptal que delimita les estructures d'emmagatzematge. Aquest epitel·li és també responsable de la seva protecció. Un cop els ous han assolit la maduresa, els espermatozoides són alliberats al lumen ovàric i es dona la fertilització. L'estratègia reproductiva d'aquesta espècie és la zigoparitat: alliberament d'òvuls fecundats, que han estat retinguts al tracte reproductor femení durant un curt període de temps i, per tant, els embrions són alliberats en estadis molt primerencs de desenvolupament.

Així, el penegal presenta una estratègia reproductiva evidentment eficaç pel fet que combina la còpula amb diversos mascles, l'autonomia de les femelles per fecundar els seus ous madurs en el moment adequat, l'inici del desenvolupament embrionari dins la mare amb alliberament de la posta envoltada per una matriu gelatinosa, i finalment la realització de diverses postes dins cada estació reproductiva per tal d'aconseguir fecunditats més elevades.

Castellà:

Helicolenus dactylopterus dactylopterus (Pisces: Scorpaeniformes), es una especie que habita profundidades de entre los 200 y 1000 m y presenta una clara distribución batimétrica en función de su talla.

Sus peculiares características reproductivas la hacen muy interesante desde el punto de vista de la biología de la reproducción. Presenta fecundación interna y

dentro el ovario contiene estructuras de almacenaje que permiten guardar el esperma durante periodos de tiempo considerablemente largos. Las células sexuales masculinas se mantienen viables gracias a varias sustancias nutritivas que obtienen de la bolsa citoplasmática y del epitelio criptal que delimita las estructuras de almacenaje. Este epitelio es también responsable de su protección. Cuando los huevos han alcanzado su madurez, los espermatozoides son liberados al lumen ovárico y se produce la fertilización. La estrategia reproductiva de esta especie es la zigoparidad: liberación de óvulos fecundados que han estado retenidos dentro el tracto reproductor femenino durante un corto periodo de tiempo y, por tanto, los embriones son liberados en estadios muy tempranos de desarrollo.

Así, *H. d. dactylopterus* presenta una estrategia reproductiva evidentemente eficaz por el hecho que combina la cópula con varios machos, la autonomía de las hembras para fecundar sus huevos maduros en el momento adecuado, el inicio del desarrollo embrionario dentro de la madre con la liberación de la puesta envuelta por una matriz gelatinosa, y finalmente, la realización de varias puestas dentro de cada estación reproductiva para conseguir fecundidades mas elevadas.

Anglès:

The bluemouth, *Helicolenus dactylopterus dactylopterus* (Pisces: Scorpaeniformes), is a species that inhabits the seabed at depths between 200 and 1000 m (Whitehead et al., 1986) and shows a clear size-dependent bathymetric distribution.

Its peculiar reproductive characteristics make it very interesting from the point of view of reproductive biology. It has internal fertilization and, inside the ovary, there are storage structures that allow it to store sperm for considerably long periods of time. These male sexual cells remain viable thanks to several nutritious substances they obtain from the cytoplasmic bag and from the cryptal epithelium that delimits the storage structures. This epithelium is also responsible for their protection. Once the eggs have reached maturity, the spermatozoa are freed in the ovarian lumen and fertilization occurs. The reproductive strategy of this species is zygoty: the liberation of fertilized ova,

which have been retained in the female reproductive tract during a short period of time and, therefore, the embryos are freed in very early stages of development.

Thus, the bluemouth exhibits an obviously effective reproductive strategy for several reasons: the females mate with several males, they are free to fertilize their ripe eggs at a suitable moment, the embryos begin to develop inside the mother so the eggs are surrounded by a gelatinous matrix when laid, and finally, eggs are laid several times every reproductive season and higher fecundity is achieved.

1. INTRODUCCIÓ GENERAL

1.1 INTRODUCCIÓ:

Els animals mostren una gran varietat d'estratègies reproductives que van des de l'oviparitat simple, amb l'alliberament de gàmetes a l'ambient i fecundació externa, fins a la fecundació interna i la viviparitat placentària. En general, la fecundació interna implica la fusió entre l'ou i l'espermatozoide quasi immediatament després de la inseminació. En altres casos, però, les cèl·lules espermàtiques són emmagatzemades dins l'ovari per un període més o menys extens de temps abans de la fecundació.

L'emmagatzematge d'esperma en els vertebrats, tant en mascles com en femelles, és un component important del procés reproductiu de moltes espècies. En els mascles, els espermatozoides produïts en els testicles maduren, són nodrits i són mantinguts en estat viable en els conductes genitals masculins. Vàries glàndules accessòries, així com també els propis conductes genitals, poden contribuir segregant components específics del fluid seminal que participaran en el manteniment i la maduració dels espermatozoides. En les femelles, els espermatozoides són, en general, guardats en òrgans o reservoris d'emmagatzematge especialitzats, com per exemple la glàndula oviducal dels elasmobranquis (Hamlett *et al.*, 2002), l'espermateca de les salamandres (Sever, 2002), els túbuls d'emmagatzematge d'esperma de les aus (Holm i Ridderstrale, 2002) i el reservori ístmic dels mamífers. En la majoria de grups de vertebrats en els que les femelles emmagatzemen esperma existeixen glàndules o vesícules macroscòpiques dedicades a aquesta tasca, però en els peixos ossis l'existència d'estructures especialitzades en aquest emmagatzematge està molt poc documentada (Hamlett, 2002).

Els modes reproductius dels teleostis són particularment interessants pel fet que presenten una enorme diversitat de patrons que van des de l'oviparitat simple fins a la viviparitat altament especialitzada, incloent diferents estadis de viviparitat lecitotròfica i matrotrofica, i les gradacions entre aquests (Wourms *et al.*, 1988). Dins d'aquest grup trobem algunes, però no moltes, espècies que són capaces d'emmagatzemar esperma a l'interior dels seus ovaris per períodes variables de temps.

En quasi totes les espècies de peixos ossis que emmagatzemen esperma intraovàricament no existeix cap estructura diferenciada. En alguns casos, com en l'espècie *Alcichthys alcicornis* (Koya *et al.*, 1997), els espermatozoides romanen flotant lliurement en el lumen ovàric durant períodes de temps relativament curts. En altres ocasions, exemplificades per *Cymatogaster aggregata* (Gardiner, 1978), els espermatozoides estan emmagatzemats durant alguns mesos amb els seus caps inclosos en les cèl·lules que componen l'epiteli ovàric. Com és típic en els poecíl·lids, les femelles de l'espècie *Xiphophorus maculatus* també són capaces d'emmagatzemar esperma viable durant alguns mesos, en aquest cas gràcies a unes cèl·lules especials que delimiten el gonoducte (Potter i Kramer, 2000). No obstant, també s'han descrit unes poques espècies que presenten mecanismes d'emmagatzematge una mica més estructurats, com és el cas de *Sebastodes paucispinis* (Moser *et al.*, 1977), on els gàmetes masculins poden ser envoltats per l'epiteli de les lamel·les ovàriques, i l'espècie *Helicolenus dactylopterus*, en el que existeixen estructures relativament especialitzades que permeten emmagatzemar els espermatozoides dins l'ovari per períodes de fins a 10 mesos (Muñoz *et al.*, 1999; 2000).

Les peculiars característiques reproductives del penegal, *H. dactylopterus*, la fan una espècie molt interessant des del punt de vista d'anàlisi de la reproducció: fertilització interna, llarg emmagatzematge d'esperma i retenció dels embrions dins els ovaris, entre d'altres. Malgrat que diversos treballs previs del nostre grup de recerca han aportat dades sobre la seva biologia reproductiva, molts detalls dels mecanismes relacionats amb aquest emmagatzematge eren absolutament desconeguts.

1.2 ANTECEDENTS:

1.2.1 Antecedents generals de l'espècie:

Helicolenus dactylopterus (DelaRoche, 1809) pertany al quart ordre més comú de peixos, l'Ordre Scorpaeniformes, que consta d'uns 250 gèneres i més de 1000 espècies. Totes elles solen presentar un cap espinós i el cos recobert d'escates, les aletes pectorals arrodonides i l'aleta caudal rarament forçada (Smith i Heemstra, 1986).

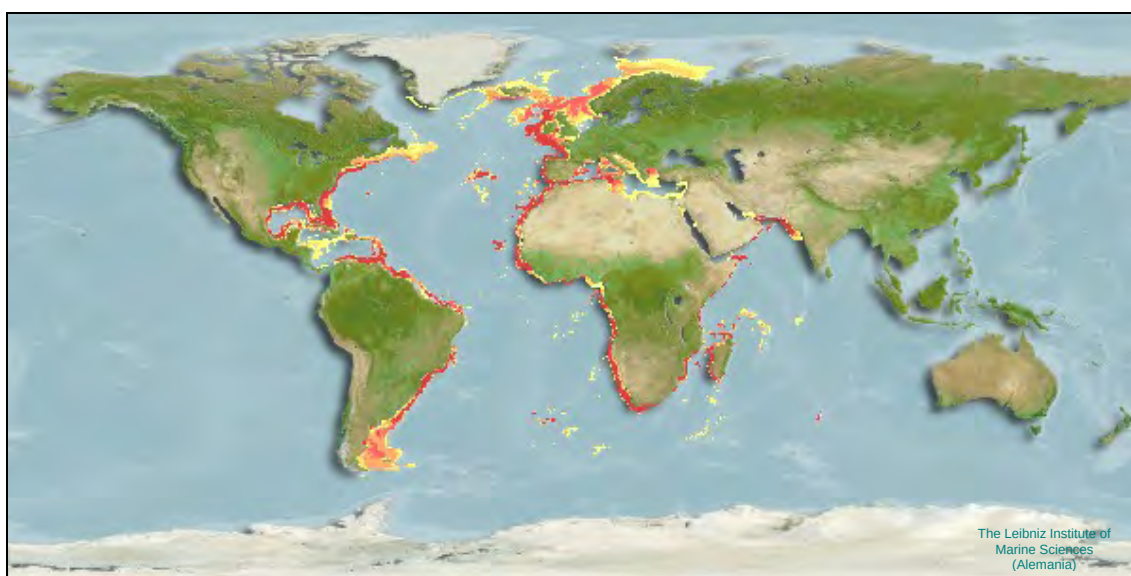
Mentre que tradicionalment se l'ha considerat membre de la família Scorpaenidae, alguns treballs relativament recents el situen dins de la família Sebastidae (Eschmeyer i Dempster, 1990; Aboim *et al.*, 2003, Iglésias, 2009), considerada com a subfamília per autors com Nelson (1994).

H. dactylopterus, anomenat comunament penegal en català, gallineta en castellà i "blue mouth" en anglès -a causa del color blau fosc que té al seu paladar-, és una espècie de cos oblong i un xic comprimit, amb el perfil dorsal més convex que el ventral. El cap és més llarg que l'alçada del cos, i presenta un rostre curt, gruixut, amb espines i plaques òssies prominents. L'orifici nasal té un apèndix adipós i l'opercle mostra dues espines posteriors fortes i una prolongació membranosa. El penegal té una boca gran, lleugerament obliqua i una mica protractil, amb el mentó prominent i unes obertures branquials moderadament àmplies (Lloris, 1986).



L'abundància i la biologia del penegal han estat estudiades en l'oceà Atlàntic per nombrosos autors (Hoffman, 1982; Isidro, 1984; Morales-Nin, 1989; Carcadó i Pestana, 1995; entre d'altres). En el mar Mediterrani, les dades disponibles en quant a la distribució i la biologia del penegal corresponen al mar Jònic (Ragonese i Reale, 1995; D'Onghia *et al.*, 1996; Romanelli *et al.*, 1997) o al seu oest (Muñoz *et al.*, 1999; Massutí *et al.*, 2000a, b).

El patró de distribució de l'espècie que ens ocupa és complex. Eschmeyer (1969) va identificar 2 subespècies atlàntiques: *Helicolenus dactylopterus dactylopterus* i *Helicolenus dactylopterus lahillei*. La primera està formada per quatre poblacions separades: Atlàntic nord-est i el Mediterrani, el Golf de Guinea, Sud-Àfrica i l'Atlàntic nord-oest. *Helicolenus dactylopterus lahillei* es troba a Argentina, Uruguai i al sud de Brasil. Aquesta subespècie va ser reconeguda per Ginsburg (1953), i confirmada per Eschmeyer (*op. cit.*). Igual que les altres poblacions d'*Helicolenus*, es considera una subespècie molt exitosa en l'àrea on es trobi (Eschmeyer i Hureau, 1971).



Posteriorment, Barsukov (1979) proposà encara més subdivisions de l'espècie: sis subespècies diferenciades per trets morfològics i per la seva distribució geogràfica: *H. d. dactylopterus*, *H. d. maderensis*, *H. d. maculatus*, *H. d. goughensis*, *H. d. angolensis* i *H. d. lahillei*.

Sigui com sigui, els exemplars analitzats en aquest estudi serien considerats *H. d. dactylopterus* pels dos autors. Formen part de la població àmpliament distribuïda a l'est de l'Atlàntic, des de Noruega fins a les costes del sud-oest d'Àfrica (Hureau i Litvinenko, 1986), i en tot el mar Mediterrani, excepte el Mar Negre (Bauchot, 1987).

Existeixen varies cites sobre la profunditat en què es pot trobar el penegal, amb un rang que va des dels 100 fins als 1200 m (Whitehead *et al.*, 1986).

Eschmeyer i Dempster (1990) el situen entre els 500 i els 1100 m a l'oceà Atlàntic, mentre que Figueredo *et al.* (1995) descriuen grans concentracions en algunes zones de la plataforma continental portuguesa, generalment en profunditats superiors als 400 m, i especialment en zones muntanyoses com la dorsal oceànica atlàntica i muntanyes marines associades. Cites més recents el troben entre 245-800 m de profunditat a l'oceà Atlàntic (Allain, 2001); essent especialment abundant entre 400 i 600 m en aquest mateix oceà segons Aboim *et al.* (2003).

H. d. dactylopterus presenta una clara distribució batimètrica en funció de la talla, essent els individus de menor talla els que estan en aigües més someres i els més grans es troben progressivament a més profunditat (Massutí *et al.*, 2000a; 2001; Ribas *et al.*, 2006). La relació positiva entre la talla i la profunditat implica una migració cap a aigües més profundes durant l'ontogènia (Cushing, 1976).

En aquest sentit, experiments de marcatge d'individus realitzats entorn l'arxipèlag de les Azores suggereixen clarament que el penegal porta una vida molt sedentària, ja que molts dels individus etiquetats foren recapturats al cap d'un any en la mateixa zona on primerament foren capturats i marcats (G.M. Menezes, no publicat). Aquests resultats coincideixen amb els obtinguts per Uiblein *et al.* (2003), treball en el que s'observa que els espècimens d'*H. d. dactylopterus* es queden al mateix lloc malgrat la presència d'un submergible. De totes maneres, encara que els adults són sedentaris, és probable que la dispersió de l'espècie es doni via larves, permetent una migració genètica efectiva a distàncies considerables. Treballs sobre anàlisis genètiques de poblacions atlàntiques (Aboim *et al.*, 2003; 2005) aprofundeixen en aquest tema.

La resta d'estudis genètics sobre *H. dactylopterus* dels que tenim coneixement s'han centrat en aspectes filogenètics (Johansen *et al.*, 1993; Kai *et al.*, 2003).

Tal i com ja s'ha comentat, *H. dactylopterus* és una espècie bentopelàgica àmpliament distribuïda tant al mar Mediterrani com a l'oceà Atlàntic. Les espècies de peixos que viuen en hàbitats bentònics d'elevada energia, localitzades principalment en muntanyes submarines i plataformes continentals,

com és l'espècie en estudi, sovint són espècies amb estratègia de tipus K. Generalment tenen vides força llargues i una taxa de mortalitat natural baixa (Rogers, 1994; Koslow *et al.*, 2000). En aquest sentit, White *et al.* (1998) conclogueren efectivament que el penegal és una espècie de creixement lent i llarga vida, coincidint amb les dades d'altres investigacions sobre els escorpènids (Echeverria, 1987; Withell i Wakowski, 1988; Golovan' *et al.*, 1991; Pearson *et al.*, 1991).

A l'Oceà Atlàntic, l'edat i el creixement d'aquesta espècie han estat estudiats mitjançant la lectura d'otòlits a Namíbia (Morales-Nin, 1989), i les Azores (Isidro, 1984). En el Mar del Nord, Hessen *et al.* (1996) documentaren el que ells consideren una invasió per part d'aquesta espècie al mateix temps que estudiaren el seu creixement. En el Mar Mediterrani, existeixen anàlisis del creixement duts a terme per Peirano i Tunesi (1986) i Ragonese (1989) en el Mar de Ligúria, Ragonese i Reale (1992) en el canal de Sicília, d'Onghia *et al.* (1996) en el nord-est del Mar Jònic, i Romanelli *et al.* (1997) i Ungaro i Marano (1995) en el sud-oest de l'Adriàtic.

Massutí *et al.* (2000b) feren un estudi comparatiu sobre l'edat i el creixement de les poblacions d'*H. dactylopterus* en el Mar d'Alborà i el Mar Balear, dos zones amb condicions oceanogràfiques i geomorfològiques diferents. Els paràmetres de creixement obtinguts de la relació edat-longitud mostraren diferències més evidents entre sexes que no entre les dues àrees en estudi: en les dues àrees, l'edat màxima i les longituds predites dels mascles foren superiors a la de les femelles. Defensen que es tracta d'una espècie de vida relativament llarga (un màxim de 30 anys), i de creixement lent: triga aproximadament 12 anys a assolir una longitud de 30 cm. Resultats similars als de Massutí també foren obtinguts per Isidro (1984), mentre que Allain i Lorange (2000) determinaren que l'edat a la que podien arribar els penegals és de 43 anys.

Tal i com és conegut, l'adquisició de mercuri per part dels teleostis marins és un procés acumulatiu, de manera que es troben majors concentracions d'aquest metall amb l'augment d'edat i pes (Windom i Kendall, 1979). El fet que els escorpènids mostrin elevats continguts en mercuri es deu a que ocupen una posició tròfica elevada i tenen una vida relativament llarga (Krüger, 1975;

Renzoni i Baldi, 1975; Jacobs, 1977). En l'estudi realitzat per Monteiro *et al.* (1991) en les espècies *H. dactylopterus* i *Pontinus kuhlii*, determinaren que durant els primers 20 anys de vida del penegal existeix un increment en la quantitat de Hg acumulat cada any. En els individus més adults l'acumulació esdevé aproximadament constant. Cal tenir present que el penegal es localitza en el quart o cinquè esglaó tròfic i és evident que el contingut de mercuri està positivament relacionat amb el nivell tròfic (Young *et al.*, 1980).

En aquest sentit, i pel que fa a la seva alimentació, diferents estudis el cataloguen com a típic depredador d'espera que ataca les seves preses a curtes distàncies i molt a prop del fons. Aquesta estratègia explica la seva coloració altament críptica.

D'acord amb Frogia (1976) a l'Adriàtic, Wertz (1977) al mar de Ligúria i MacPherson (1979) a l'oest del Mediterrani, *H. dactylopterus* s'alimenta preferentment d'organismes bentònics, concretament crustacis, peixos i plàncton gelatinós (Würtz, 1977; 1985; Mianzan *et al.*, 1996; Gaertner *et al.*, 1999; Nouar i Maurin, 2000). La part més important de la seva dieta la formen crustacis decàpodes (Natantis, Braquiurs i Macrurs) i peixos. En menor proporció també s'alimenta d'eufausiàcids, pirosoemes i poliquets (Boutiere, 1950; Frogia, 1976). Les proporcions d'aquestes preses varien en funció de la talla del depredador, però no s'han observat variacions anuals importants en la composició de la dieta. Ara bé, presenta una DR (*Daily Ration*) o consum d'aliment per dia superior en els mesos d'estiu que en la resta de mesos de l'any (Madurell i Cartes, 2005). Aquesta tendència a un major consum a l'estiu coincideix amb un màxim de disponibilitat d'aliment, sobretot d'eufasciàcids i decàpodes mesopelàgics com *Pasiphaea sivado* i *Sergestes arcticus*. Per últim, cal destacar que, malgrat ser una espècie de fons, els autors citats anteriorment assenyalen que alguns individus abandonen amb certa freqüència aquest fons per buscar aliment.

Pel que fa a la importància econòmica de l'espècie objecte d'estudi, cal destacar que el penegal es troba regularment als nostres mercats. Majoritàriament és capturat com a espècie acompanyant en pesqueres dirigides a la captura de crustacis o bé amb mètodes més selectius com

palangres i xarxes de fons (Bauchot, 1987; Lloris i Messeguer, 2000; Santos *et al.*, 2002). Segons White *et al.* (1998) és una espècie amb una importància comercial en augment als Estats Units. Menezes *et al.* (1997) la consideren una de les espècies més importants en els recursos pesquers de l'arxipèlag de les Azores, després de *Pagellus bogaraveo* que n'és la principal. A la península, té un interès comercial creixent degut a la recerca de nous recursos per part de la flota pesquera, com a conseqüència de l'esgotament dels tradicionals. És l'espècie d'escorpènid més apreciada, amb un valor comercial notable tal i com mostren les dades de 2003: un total de 48.119 kg van ser pescats a les confrades catalanes per un valor de 185.722,50 € (DARP, 2004) o les del 2008: 50.610 kg (197.336,5 €) (DARP, 2008).

Actualment el valor comercial del penegal ha augmentat notablement, i els preus al consumidor estan entorn els 10-12€/kg, depenent sobretot al volum d'exemplars pescats aquell dia. Les peces de mida mitjana (d'uns 20 cm) tenen un preu aproximat d'uns 11-12 €/kg, mentre que si els exemplars són molt més grans els preus s'acosten cap als 17-18 €/kg.

En aquest sentit, val a dir que les espècies de profunditat, com és la que ens ocupa, han estat més explotades en molts països degut a la progressiva disminució dels recursos tradicionals. Vint-i-dues espècies van ser capturades per la flota espanyola en aigües atlàntiques i analitzades en "Work Group of Depth Species of ICES" (ICES, 2005). *H. dactylopterus* va ser l'espècie que va mostrar un major increment en les taxes de captures (200%) entre l'any 2003 i el 2004.

Molts dels autors citats anteriorment i en l'apartat que ve a continuació defensen la importància d'estudiar la biologia d'aquesta espècie. Mentre que per una banda sembla que podria estar potencialment infrautilitzada, existeix també certa preocupació respecte la situació de la seva població. Les seves característiques biològiques la fan especialment susceptible a la sobreexplotació: baixa densitat poblacional, creixement lent, alta longevitat i maduració tardana. A més, s'hi sumen factors com l'escassa informació sobre la seva estructura poblacional i distribució.

1.2.2 Antecedents sobre la biologia reproductiva de l'espècie:

L'enorme diversitat sistemàtica dels Teleostis i la varietat d'hàbitats on podem trobar-los es veuen reflectides en la considerable quantitat d'estratègies diferents que aquests animals adopten per tal d'assegurar el seu èxit reproductiu. La diversitat reproductiva inclou des de modes de reproducció no especialitzats com és l'alliberament de gàmetes a l'ambient aquàtic (fecundació externa, la més comuna en els teleostis) fins a d'altres en què els espermatozoides són introduïts dins el tracte reproductor femení, amb fecundació interna. Aquests últims poden pondre els ous immediatament després de fertilitzar-los o bé gestar els embrions durant períodes de temps molt variables.

Així doncs, els Teleostis presenten una gran varietat de patrons reproductius. Tradicionalment aquests s'han agrupat en dues categories principals, que són l'oviparisme i el viviparisme, però alguns autors diferencien tres subgrups dins la primera categoria: l'ovuliparitat, la zigoparitat i l'embrioparitat (Blackburn, 1982; Wourms *et al.*, 1988). L'ovuliparitat es refereix a l'alliberament dels ous des del tracte reproductiu de la femella seguit per la subseqüent fecundació o activació en el medi extern. La zigoparitat consisteix en l'alliberament d'òvuls fecundats, o ginogenèticament activats, que han estat retinguts al tracte reproductiu femení durant un curt període de temps i, per tant, els embrions són alliberats en estadis molt primerencs de desenvolupament. Finalment, en l'embrioparitat es forma un embrió completament desenvolupat dins el cos de la femella abans del seu alliberament al medi extern, existint posteriorment l'eclosió amb el consegüent trencament de l'embolcall de l'ou.

Val a dir que Munehara *et al.* (1989) van descriure una subcategoria de l'ovuliparitat anomenada "associació gamètica interna", en la que els gàmetes masculí i femení s'associen dins la femella però no es dona la fusió dels nuclis gamètics fins que s'allibera al medi extern. Encara que els gàmetes masculins penetren pel micròpil dels ous ovulats, la fertilització no es dona a la cavitat ovàrica sinó que s'esdevé quan els ous són alliberats a l'aigua marina (Koya *et*

al.,1993a). Les espècies que utilitzen aquest mètode reproductiu estan àmpliament confirmades dins la superfamília Cottoidea, dels Scorpaeniformes (Munehara *et al.*, 1991; 1997; Koya *et al.*, 1993b; Munehara, 1997)

El penegal és una espècie amb fecundació interna i zigòpara (Muñoz *et al.*, 1999; Sequeira *et al.*, 2003) que duu a terme varies postes en una mateixa estació reproductiva. Estudis preliminars (Muñoz i Casadevall, 2002) li adjudiquen una fecunditat total relativament elevada (11000-87000 ous) comparada amb la d'altres escorpènids com *Scorpaena porcus* -amb un màxim de 20000 ous (Sàbat, 2005)- o bé *Scorpaena notata* –uns 33000 ous- (Muñoz i Casadevall, 2002), malgrat que aquests escorpènids presenten fecundació externa. La fecunditat concreta de cada posta del penegal sembla ser molt variable: entre 1212 i 20504 ous per posta segons el treball d' Allain (2001), de 90 a 22600 ous pels autors Terrats i Petrakis (2001) i en el treball de Muñoz *et al.* (en revisió) s'estima al voltant dels 5000 ous per cada posta.

En relació a la talla de maduració sexual, les femelles d'aquesta espècie en el mar Mediterrani maduren a una longitud estàndard d'uns 14,5 cm mentre que els mascles assoleixen la maduresa sexual a una longitud lleugerament inferior, 13 cm (Muñoz i Casadevall, 2002). En un estudi centrat en individus del nord-oest d'Escòcia i Irlanda (Kelly *et al.*, 1999), els autors resolgueren que la maduració s'assolia més tard, en individus que mesuraven uns 23 cm, als 13 anys d'edat. Els treballs de White *et al.* (1998) reafirmen aquesta premissa ja que determinaren que els mascles atlàntics assoleixen la maduresa potencial als 14-15 anys (25-27 cm) i les femelles a 10-15 anys (21-29 cm).

Pel que fa a la proporció sexual, la població estudiada per Ribas *et al.* (2006) mostrà un sex ratio d'1:1, malgrat que en les classes de mida mitjana predominaven les femelles i en les classes de mida més gran hi havia una clara predominància dels mascles. Fins assolir la maduresa sexual, els mascles i les femelles són igualment representats en la població. A partir d'aquest moment, les femelles han d'invertir molta més energia en la maduració gonadal que no els mascles, els quals poden destinar més energia al seu creixement (Gunderson, 1997), tal i com també determinen White *et al.* (1998) en el seu

treball. El desenvolupament d'una matriu gelatinosa dins l'ovari per englobar els ous fertilitzats, i la relativament alta fecunditat d'aquesta espècie (Muñoz i Casadevall, 2002), impliquen que les femelles tenen un cost energètic elevat durant la reproducció.

Per últim, cal destacar especialment la capacitat d'emmagatzemar esperma que té l'espècie objecte d'estudi. L'emmagatzematge intraovàric d'esperma en Teleostis ha estat estudiat en algunes espècies al microscopi òptic (Tateishi *et al.*, 1958; Moser, 1967b; Shinomiya, 1985; Takemura *et al.*, 1987; Koya *et al.*, 1994; Burns *et al.*, 1995) i només en poques amb microscopi electrònic (Gardiner 1978; Hayashi, 1990; Koya *et al.*, 1997; Muñoz *et al.*, 1999; 2000; 2002a; Vila *et al.*, 2007a,b). Les modificacions que aquest emmagatzematge ha comportat en els ovaris van des de petits canvis molt simples sense donar lloc a estructures diferenciades, fins a especialitzacions més importants, tal i com s'ha detallat en l'apartat anterior.

En aquest sentit ja s'ha destacat la peculiaritat d'*Helicolenus dactylopterus*, capaç d'emmagatzemar espermatozoides durant llargs períodes de temps dins d'unes estructures ovàriques especialitzades. A més, el grau de sofisticació de la seva modalitat reproductiva li permet, sense deixar de ser una espècie ovípara, retenir durant cert temps els ous fecundats i assegurar així una major supervivència de la posta per períodes de temps variables, esperant possiblement les millors condicions ambientals per alliberar-los.

Així doncs, a partir dels antecedents existents es fa clarament palès que ens trobem davant d'una espècie comuna a les nostres aigües, amb un interès comercial notable i en augment i amb una biologia reproductiva peculiar, trets que la fan especialment interessant per a l'estudi.

1.2 Objectius del treball:

El treball de recerca que es presenta s'emmarca dins la línia d'investigació del Grup de recerca de Biologia Animal (Ictiologia) de la Universitat de Girona, i s'ha desenvolupat dins els projectes :

- “Efecto de la pesca sobre la estrategia reproductiva de la gallineta (*Helicolenus dactylopterus*, Pisces: Scorpaenidae”. MEC. CTM2004-04136. 2004-2005.
- “Estructura poblacional y ecología reproductiva de *Helicolenus dactylopterus* en la plataforma ibérica”. MEC. CTM2006-13964-C03-00. 2006-2009.

Els objectius principals d'aquest treball són:

- A. Descriure macroscòpicament i microscòpicament el cicle reproductiu de l'espècie. Analitzar l'estructura i la ultraestructura de les gònades i les cèl·lules germinals al llarg del cicle anual.
- B. Analitzar el procés d'emmagatzematge d'espermatozoides que duu a terme el penegal. Concretament s'incidirà en la morfologia i organització dels espermatozoides que entren a l'ovari, el procés de formació de les criptes d'emmagatzematge, els mecanismes que permeten mantenir viables els espermatozoides emmagatzemats i l'evolució d'aquest emmagatzematge al llarg del cicle reproductiu.
- C. Estudiar el desenvolupament embrionari que es dona dins de la femella i les característiques de la seva posta.

2. MATERIAL I MÈTODES

2. MATERIAL I MÈTODES:

2.1 Material recol·lectat:

A les taules que es presenten a continuació s'indica el nombre, sexe i el rang de longitud total (LT, mm) dels exemplars utilitzats en els diferents tipus d'anàlisi:

2.1.1 Anàlisi histològica, morfomètrica i gravimètrica:

Dates recol·lecció	Mascles		Femelles	
	N	Rang LT (mm)	N	Rang LT (mm)
Gener	46	202-372	51	192-331
Febrer	73	151-376	77	163-380
Març	12	244-396	17	213-397
Abril	18	216-315	19	235-314
Maig	12	241-350	15	167-357
Juny	9	223-279	4	188-242
Juliol	10	236-299	2	252-257
Agost	4	151-265	6	184-313
Setembre	2	181-260	9	162-254
Octubre	5	179-322	9	161-320
Novembre	8	213-380	6	235-345
Desembre	13	208-304	21	183-290
TOTAL	212		236	

2.1.2 Anàlisi ultraestructural:

Dates recol·lecció	Mascles		Femelles	
	N	Rang LT (mm)	N	Rang LT (mm)
Gener	3	187-279	4	160-183
Febrer	-	-	2	178-249
Març	-	-	2	227-349
Maig	3	160-195	1	187
Juny	-	-	4	178-231
Juliol	-	-	2	247-251
Novembre	4	205-239	2	191-219
TOTAL	10	160-259	17	150-347

2.1.3 Anàlisi immunohistoquímica:

Dates recol·lecció	Mascles		Femelles	
	N	Rang LT (mm)	N	Rang LT (mm)
Gener	1	167	2	150-183
Maig	3	160-195	1	187
Juny	-	-	4	178-231
Novembre	3	205-219	1	191
TOTAL	7	160-219	8	150-231

2.2. Mètodes:**2.2.1 Mètodes de recol·lecció i fixació dels especímens:**

Les mostres obtingudes durant els anys 2003, 2004, 2005 i 2006 provenen tant de l'embarcació "Som i Serem" del port de Palamós com de l'embarcació "Palandriu" del port de Llançà.



Ara bé, la gran majoria d'exemplars utilitzats en l'estudi que es presenta procedeixen de diferents ports de la Costa Brava (Palamós, Llançà, Roses....) i foren capturats durant els anys 2007 i 2008.

Una petita part dels espècimens foren recol·lectats directament de les llotges de Palamós i Roses, quan el material recol·lectat per les embarcacions no era suficient. Aquests últims es fixaven ràpidament i anaven destinats exclusivament a l'anàlisi histològica de les gònades mitjançant el microscopi òptic, ja que les gònades observades al microscopi electrònic han de provenir d'individus disseccionats immediatament després de sacrificar-los.

L'art de pesca utilitzat per a la captura dels exemplars és el palangre. Aquest art consisteix fonamentalment en una línia mare amb molts hams units a ella mitjançant altres línies més primes, les braçolades. Aquestes estan separades entre sí per una distància que evita que es creuin entre elles i que s'adequa a l'espècie objectiu.

Els palangres porten les mesures necessàries per tal d'assegurar la seva flotabilitat (flotadors), fondeig (pedres) i boies, i es pesca a una determinada profunditat en funció de la distribució d'aquests elements.

La freqüència del mostreig va ser mensual en el cas de les mostres destinades a anàlisis morfomètriques, gravimètriques o histològiques. A principis de cada mes es deixava un bidó amb uns 5-7 litres de formol al 10% per tal que el pescador introduís els espècimens pescats directament al seu interior a fi de fixar-los immediatament després de la captura. El dia que l'embarcació arribava a port amb el bidó ple de mostres s'anava a recollir per dur-lo al laboratori i alhora se li deixava un altre bidó amb formol pel següent mes. Després d'unes 2 setmanes les mostres es traslladaven a un bidó al 4% on es deixaven aproximadament una setmana més abans de procedir a la seva anàlisi.

Quan es tractava d'aconseguir individus per a l'anàlisi mitjançant microscopia electrònica, la freqüència de mostreig depenia del moment del cicle reproductor que interessés estudiar.

Per aquestes mostres es requereix que els individus estiguin vius immediatament abans de la dissecció. El procediment que es va seguir és el

següent: els mateixos pescadors introduïen els exemplars capturats en un bidó ple d'aigua de mar, per tal de mantenir-los vius fins arribar a port. Se'ls hi anava renovant l'aigua periòdicament i s'introduïa al bidó un oxigenador perquè no s'esgotés l'oxigen de l'aigua. Quan arribaven a port es recollien els penegals vius en un bidó amb una mica d'aigua marina i es transportaven al laboratori de la universitat per tal de procedir a la dissecció i fixació de les gònades.

Pel que fa a les mostres d'embrions, la recol·lecció es concentrava a l'època en què les femelles presenten una gran quantitat de fluid ovàric amb embrions encara retinguts al seu interior, concretament el mes de març.

Es procedia a recol·lectar individus femelles que presentessin un abdomen considerablement inflat. En un primer moment, aquestes mostres foren fixades directament en formol al 10% i dues setmanes després es passaven al formol 4%.

Les primeres observacions al microscopi de les mostres de fluid fixat amb formol van revelar que els ous apareixien parcialment deformats, de manera que es va establir un protocol a partir de mostres fresques.

El procediment d'obtenció del fluid ovàric és el següent: es tallava amb tisores la membrana ovàrica del final de la gònada. Si la quantitat de fluid era molt important aquest queia pel seu propi pes en un vial, i si el fluid era més escàs, es retirava amb pinces amb molta cura i es dipositava dins el receptacle. Seguidament es dipositava una petita fracció de fluid en un portaobjectes i es procedia a l'observació microscòpica.



2.2.2 Mètodes d'anàlisi de l'evolució anual de la morfologia gonadal:

Les gònades fresques, tan els ovaris com els testicles, presenten una consistència més aviat flonja, de manera que, per tal de poder obtenir talls transversals que ens mostressin quina era la morfologia de les gònades en cada època de l'any, s'utilitzaren els ovaris i els testicles fixats en formol. Pel fet d'estar fixades aquestes gònades, a part de mantenir la morfologia original, permetien ser tallades perfectament sense alterar la seva forma.

2.2.3 Mètodes d'anàlisi dels trets morfomètrics i gravimètrics:

Els individus eren mesurats i pesats sencers. Posteriorment eren disseccionats i pesats de nou, eviscerats. Finalment se'ls etiquetava.

Després de la dissecció se'ls extreien les gònades i es determinaven macroscòpicament o bé sota la lupa. En cas de dubte una petita fracció de la gònada s'observava sota el microscopi òptic. Un cop sexades, les gònades eren pesades i guardades en un vial degudament etiquetat ple d'alcohol de 70°. Pel que fa referència a la resta de les vísceres, el fetge era pesat i el greix que cobria les vísceres també. Els estómacs també eren guardats en alcohol de 70° per a possibles estudis posteriors.

Els caràcters morfomètrics mesurats en cada espècimen i l'aparellatge utilitzat són els següents:

-*Longitud total* (ictiòmetre): Distància mínima en línia recta horitzontal, entre l'extrem més anterior del morro i l'extrem posterior de l'aleta caudal, presa amb precisió de mm. Aquesta mesura s'ha utilitzat pels diferents anàlisis morfomètrics perquè és un paràmetre utilitzat en la majoria de bibliografia existent, de manera que facilita les possibles comparacions.

-*Longitud estàndard* (ictiòmetre): Distància mínima en línia recta horitzontal, entre el morro i l'extrem posterior de la columna vertebral, presa amb precisió de mm.

-*Longitud pre-anal* (ictiòmetre): Distància horitzontal entre el morro i el marge anterior de l'aleta anal, presa amb precisió de mm.

-*Pes total* (balança Sartorius 1103): pes total de l'exemplar, prèviament a l'evisceració, amb una precisió de 0,1 g.

-*Pes eviscerat* (balança Sartorius 1103): pes de l'individu, un cop eviscerat, amb una precisió de 0,1 g.

-*Pes de les gònades* (balança Precisa 125A): pes de les gònades, pres amb una precisió de 0,1 mg.

-*Pes del fetge* (balança Precisa 125A): pes del fetge, pres amb una precisió de 0,1 mg.

-*Pes del greix* (balança Precisa 125A): pes del greix que apareix per sobre i entre les vísceres, pres amb una precisió de 0,1 mg.

Amb aquestes dades es calcularen diferents índexs relacionats amb la reproducció:

Índex Gonadosomàtic (IGS):

És un índex que mesura el nivell d'activitat de les gònades al llarg de l'any.

Presenta valors creixents lligats amb la maduració i valors màxims en l'època de posta. Es calcula en funció del pes eviscerat per tal d'evitar les possibles desviacions que podrien produir en el seu valor el contingut digestiu, reserves hepàtiques o les reserves de greix mesentèric.

$$\text{IGS} = \text{Pes gonadal} \times 100 / \text{pes eviscerat}.$$

Índex Hepatosomàtic (IHS):

Aquest índex mesura quantitativament les variacions en el pes del fetge, que reflecteixen el procés d'emmagatzematge i transferència de proteïnes i lípids associats amb l'esforç reproductiu (Crupkin *et al.*, 1988). Els valors màxims d'aquest índex solen assolir-se abans de l'època de maduració. Igual que en el cas anterior, també es calcula en funció del pes eviscerat.

$$\text{IHS} = \text{Pes del fetge} \times 100 / \text{pes eviscerat}$$

Factor de condició morfomètric:

Aquest índex indica l'estat de nodriment de l'individu. La maduració gonadal requereix bones condicions fisiològiques i, a més, la posta sol produir una pèrdua de pes considerable, fets que es poden evidenciar amb aquest índex.

D'entre els índexs morfomètrics (que es calculen simplement amb els valors individuals de talla i pes), el factor de condició de Fulton (K) ha estat àmpliament utilitzat i aplicat a moltes espècies de peixos durant molts anys (Fulton, 1904; Frost i Kipling, 1967; Bolger i Connolly, 1989; Lloret *et al.*, 2000). Aquest factor K es calcula segons la fórmula:

$$K = \text{PE} / (\text{LT})^3 \times 100$$

On PE és el pes eviscerat (en gr) i LT és la longitud total (en cm).

El càlcul de K assumeix un creixement isomètric perquè la longitud és elevada a la tercera potència. L'assumpció del creixement isomètric és una aproximació acceptable per moltes espècies (Jones *et al.*, 1999; Bister *et al.*, 2000; Kimmer *et al.*, 2005), però no per totes. Si calculant la recta de regressió entre el LnLT i LnPE el pendent surt proper o lleugerament major a 3, el càlcul de la condició amb el factor de condició de Fulton seria adequat. Si el paràmetre b difereix del valor 3, la K augmentaria (si $b > 3$) o disminuiria (si $b < 3$) proporcionalment a la talla i el factor de Fulton no ens donaria idea de la condició real dels individus. Ara bé, malgrat que s'han proposat nombroses i útils alternatives, el factor de condició de Fulton ha estat un dels més usats en múltiples estudis degut a la seva simplicitat i la seva precedència històrica.

D'entre els factors de condició alternatius, Le Cren (1951) proposà un model per calcular un nou factor de condició anomenat condició relativa:

$$K_n = \text{pes observat} / \text{pes calculat}$$

El pes calculat és el pes teòric d'un individu a una talla determinada i es calcula segons l'equació clàssica de relació talla-pes ($\text{Pes calculat} = a.LT^b$, on els valors a i b es calculen empíricament per regressió de tots els individus de la població). Valors de $K_n > 1$ indiquen que l'individu té una condició millor que la que té la mitjana (del conjunt) de la població mentre que valors de $K_n < 1$ indiquen que l'individu té una condició pitjor que la mitjana de la població. Aquest índex relatiu és actualment un dels més utilitzats per avaluar la condició fisiològica dels peixos (Samat *et al.*, 2008; Wambiji *et al.*, 2008; Hussey *et al.*, 2009).

Cal remarcar que pels càlculs d'aquest factor s'ha utilitzat el PE perquè el pes eviscerat no té en compte les vísceres ni les gònades i, per tant, és una expressió més bona de la condició real. Altrament, el contingut estomacal o l'estat de desenvolupament de les gònades afectarien la condició calculada amb els pesos totals.

2.2.4 Mètodes d'anàlisi histològica:

Les mostres gonadals foren tractades utilitzant dos mètodes d'inclusió: la parafina i el 2-hidroxietil metacrilat o glicol metacrilat (GMA). La gran majoria de les mostres foren incloses en parafina, ja que aquest mètode dona la possibilitat de treballar amb un major nombre de tincions diferents que poden aportar informació complementària, alhora que permet realitzar tincions immunohistoquímiques. Pel que fa al glicol metacrilat, l'avantatge que confereix és que permet fer talls més fins i nítids de les mostres, i per tant obtenir millors microfotografies i mesures més acurades.

El protocol d'ambdós mètodes d'inclusió és lleugerament diferent:

Parafina:

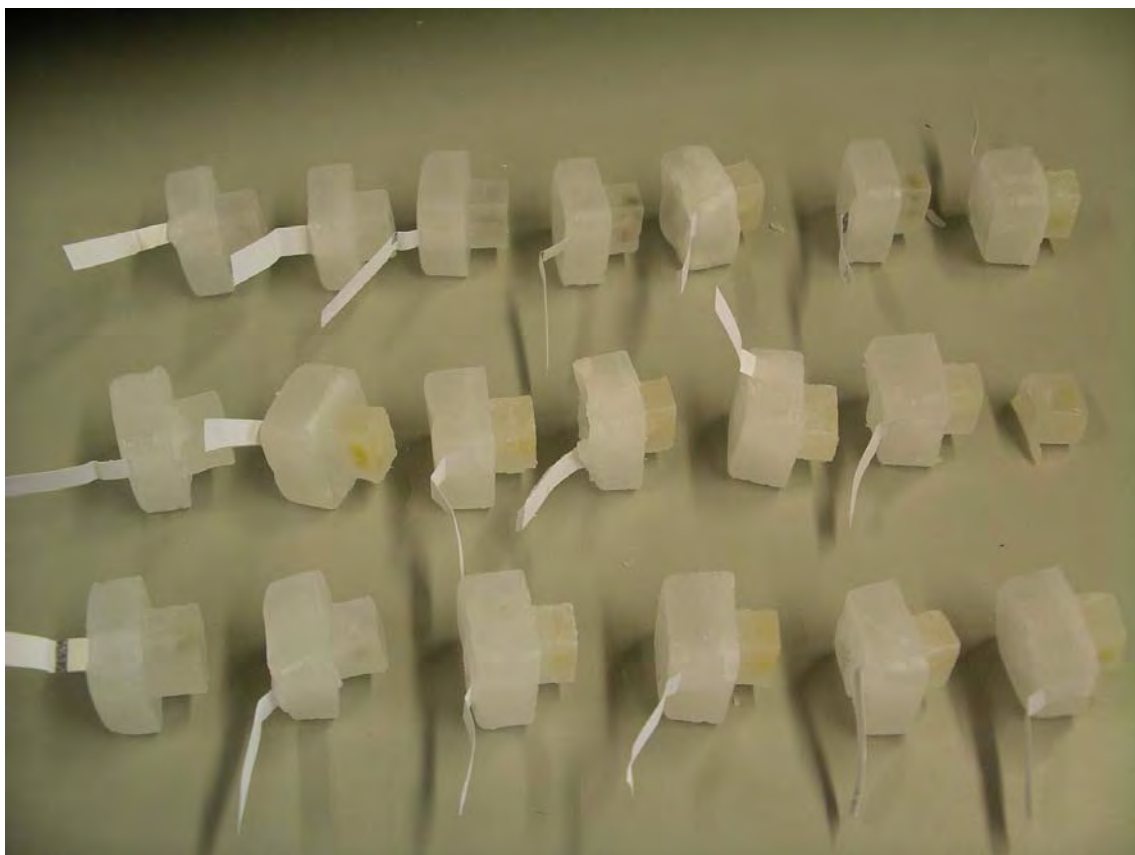
*Deshidratació. Petits fragments de les parts anterior, central i posterior de les gònades conservades en alcohol 70° es deshidrataven seguint la sèrie alcohòlica següent:

- Alcohol 96° (2 canvis, el primer d'1h 30' i el segon d'1h.)
- Alcohol 100° (3 canvis d'1h cadascun).

Seguidament es submergien en essència d'eucaliptol durant 12-24 h.

*Imbibició: 2 canvis de xilol d'1 h cadascun.

*Inclusió: La parafina utilitzada era parafina pF 56-58°C Panreac. Es feien 2 canvis, un de 5 h i 30' i l'altre com a mínim de 3 h. Després les mostres es transferien en motlles de plàstic col·locant-les en la direcció adequada per ser tallats després. Un cop coberts de parafina els motlles es deixaven en un recipient amb gel per tal que la parafina solidifiqués en forma de blocs.



*Microtomia: Els blocs obtinguts es tallaven amb un micròtom de rotació Medin seccionant talls d'un gruix d'entre 4 i 12 μm , depenent de la naturalesa dels talls inclosos. Les gònades van ser tallades tan transversalment com longitudinalment, en tota la seva llargada.

Glicol metacrilat:

*Deshidratació: La sèrie alcohòlica pels fragments que es volien incloure en GMA fou la mateixa que en el cas de la parafina, afegint un pas més al principi d'alcohol 80° durant 1 h.

*Inclusió: S'utilitzà el mètode d'inclusió per polimerització en fred descrit per Bonet i Molinas (1983):

Solució infiltradora: 2-hidroxietil metacrilat (GMA) (monòmer)----- 80ml
 2 butoxietanol (regulador) ----- 8 ml
 Benzoil peròxid (polimeritzador)----- 0,5g

Solució promotora: CARBOWAX ----- 8 ml
 N-N dimetilanilina ----- 1 ml

Les mostres es transferien a la solució infiltradora (2 canvis de 12 h cadascun) i seguidament es disposaven en recipients de plàstic (polietilè) d'1ml de volum orientant-les segons el pla en què es volien tallar. S'hi injectava una barreja de la solució infiltradora i la promotora en una proporció de 42:1 (preparada en un bany de gel), i es col·locaven els motlles a la nevera a 4° C per tal que es donés la polimerització.

*Microtomia: El micròtom utilitzat per seccionar els blocs de GMA fou el model Autocut 1150 Reichert-Jung, obtenint talls de 5 µm de gruix.

TINCIONS:*** Hematoxilina-Eosina:**

Aquesta és una coloració general pels teixits animals, una de les més usades perquè és un mètode senzill, ràpid i segur. Es basa en l'ús d'un colorant acidòfil, l'hematoxilina, que bàsicament tenyeix el nucli, i un colorant basòfil, l'eosina, que tenyeix el citoplasma de les cèl·lules. El protocol de tinció usat és el següent:

Es desparafinaven els talls i s'hidrataven amb la sèrie alcohòlica següent: xilol (2 cops durant 15'), alcohol 100° (5'), alcohol 96° (5'), alcohol 70° (5'), aigua destil·lada (1').

Un cop hidratats els talls es tenyien durant 2' amb Hematoxilina de Delafield i es rentaven amb aigua destil·lada. Seguidament es viraven els talls amb alcohol amoniacal (5') i es tornaven a rentar amb aigua destil·lada. Llavors es procedia a tenyir els talls amb eosina aquosa a l'1% (10') i s'aplicava la sèrie de deshidratació següent: alcohol 70° (2'), alcohol 96° (2'), alcohol 100° (2'). Aclaríem després amb essència d'eucaliptol (15'), fèiem la imbibició en xilol dues vegades (3') i finalment muntàvem amb DPX per observar seguidament els talls sota el microscopi òptic.

*** Coloració tricròmica de Mallory:**

Les coloracions tricròmiques s'utilitzen per la distinció fàcil de les masses connectives (substància intercel·lular) usant tres colorants: un colorant nuclear que tenyeix el nucli (Fucsina), i dos colorants de contrast: l'Orange G que tenyeix el citoplasma i té una penetració ràpida i el Blau d'Anilina, que tenyeix la substància intercel·lular i té una penetració més lenta.

Primerament es desparafinaven i s'hidrataven els talls i es tractaven amb el mordent o sublimat corrossiu (15'). Es rentaven uns segons amb aigua destil·lada i es tenyien els talls durant 15'' amb fucsina àcida a l'1%. Es tornaven a rentar amb aigua destil·lada i es tractaven amb el mordent àcid fosfomolíbdic a l'1% (60''). Es rentaven altre cop amb aigua destil·lada i es tenyien les preparacions amb el líquid de Mallory (75''). Es rentaven durant uns segons en aigua destil·lada i es diferenciaven amb blau d'anilina W.S. a l'1% (en etanol) (10''). Un cop fet això es deshidrataven els talls i es feien dues imbibicions en xilol de 3' cada una. Ja finalment es muntaven els portaobjectes per poder observar les preparacions.

*** Coloració Pas-Schiff:**

Aquesta coloració és específica per diferenciar els mucopolisacàrids neutres. Les mucosubstàncies amb hexosa i/o àcid siàlic es tenyeixen de color rosa o vermell brillant, mentre que les fibres de reticulina, membranes basals i glàndules mucoses no prenen colors tant vius respecte el fons lleument tenyit.

En primer lloc es desparafinaven els talls, s'hidrataven i s'oxidaven amb àcid periòdic a l'1% en aigua destil·lada (10'). Es rentaven després amb aigua corrent (10') i uns segons amb aigua destil·lada. A continuació es tractaven els talls amb el reactiu de Schiff (10'), es rentaven amb aigua corrent (10') i uns segons amb aigua destil·lada. Seguidament es tenyien amb Hematoxilina de Groat (2') i es rentaven de nou amb aigua corrent (5'). Es tenyien després amb Orange G-molíbdic (3'), es rentaven uns segons amb aigua destil·lada i es deshidrataven els talls. S'aclarien les preparacions amb essència d'eucaliptol (15'), es feien dues imbibicions en xilol de 3' cada una i es muntaven les preparacions amb DPX.

*** Coloració blau de toluidina:**

El blau de toluidina és un colorant metacromàtic que s'usa per les tincions generals d'histologia. És molt útil per identificar i descriure les estructures dels teixits usant una coloració ràpida i senzilla.

En primer lloc es desparafinaven els talls i s'hidrataven. S'assecaven les vores i es procedia a tenyir-los amb blau de toluidina durant 5'. Passat aquest temps es feien 2 rentats amb aigua destil·lada (2' cada un) i es procedia a sotmetre'ls a la sèrie de deshidratació. Llavors es posaven en una cubeta amb Xilol (3' dues vegades), s'assecaven les vores dels talls i es muntaven amb DPX.

*** Lectines**

A part de les tincions habituals en histologia, també s'aplicà una tinció específica basada en l'ús de lectines per tal de determinar si algunes estructures presentaven o no algun component glucídic.

Les lectines constitueixen un interessant grup de proteïnes d'origen no immune que comparteixen la propietat d'enllaçar-se de forma específica i reversible

amb carbohidrats, ja siguin lliures o que estiguin formant part d'estructures més complexes.

Contenen com a mínim 2 llocs d'unió, raó per la qual poden unir-se primer a un sucre específic i de manera secundària a una molècula glicosilada.

Per les seves propietats, les lectines són considerades eines de gran valor en els laboratoris biològics, ja que s'utilitzen en nombroses investigacions com: estudis d'estructura de membrana, detecció de transformacions malignes, assaigs histoquímics, enzimàtics i en la tipificació dels grups sanguinis.

Protocol basat en els treballs de Walter *et al.*, 2005 i Pinart *et al.*, 2001.

Les lectines utilitzades foren les següents:

- RCA (*Ricinus Communis Agglutinin*) que s'uneix al carbohidrat B-d-Gal-(1,4)-d-GlcNAc
- WGA (*Triticum vulgaris*) que s'uneix als carbohidrats GlcNAc > àcid siàlic
- LCA (*Lens culinaris*) que interacciona amb els sucres α -d-Man > α -d-Glc
- UEA (*Ulex europeus*) que s'uneix reversiblement a la α -l-Fuc

Totes les lectines utilitzades estaven biotinitzades i foren obtingudes de SIGMA Chemicals (Vienna, Austria).

S'obtenien talls seriatos de parafina muntats en portaobjectes de poly-L-lisina i es desparafinaven en xilol (2 canvis de 5' cada un). Seguidament es rehidrataven les seccions amb la següent sèrie alcohòlica: 2 x 100°, 2 x 96°, 2 x 70° (2' cada canvi) i s'inactivava la peroxidasa endògena amb la següent solució: 40 ml metanol + 1,5 ml d'H₂O₂ al 30%, s'enrasava fins a 50ml amb H₂O destil·lada i s'incubaven les seccions 10' a temperatura ambient.

A continuació es rentaven els portaobjectes amb H₂O corrent (10') i es procedia a bloquejar els dominis d'unió inespecífics amb una solució de 1% BSA (Bovine Serum Albumin) en PBS incubant-los 30' a temperatura ambient.

Després es diluïa la lectina en 0,1% BSA en PBS a una concentració final d'uns 10-25 µg/ml i s'incubaven les seccions amb aquesta solució durant 1 h a temperatura ambient.

En aquest punt es realitzaven controls incubant les seccions sense la lectina.

Passat el període d'incubació es feia un rentat en PBS (3 canvis de 5'cada un) i s'incubaven de nou les seccions durant 10' a temperatura ambient amb la següent solució:

50 mg DAB + 50 ml tampó TRIS (pH:7,4) + 0,5 ml H₂O₂ 3%

Passat aquest temps s'aturava la reacció en H₂O destil·lada durant 5' i se'ls aplicava una tinció nuclear amb Hematoxilina de Delafield (5').

Finalment se sotmetia als talls a una sèrie de deshidratació 2 x 70°, 2 x 96°, 2 x 100°, 2 x xilol (2' cada canvi) i es muntava amb DPX.

Reactius:

- PBS: Solució A: 2,340g d'NaH₂PO₄ x 2H₂O + 150 ml d'H₂O destil·lada
Solució B: 17,908g d'Na₂HPO₄ x 12H₂O + 500 ml d'H₂O destil·lada.
Barregem la solució A i la solució B i obtenim el tampó amb un pH de 7,2.
- Tampó TRIS (pH:7,4): 15,14g TRIS + 400ml H₂O destil·lada i ho agitem bé. Anem afegint HCL 1N fins assolir una solució amb un pH de 7,4. Enrasem fins a 500 ml.

*** HRP (Horseradish Peroxidase):**

La utilització de l'HRP com a marcador ha permès demostrar l'existència de l'anomenada "blood-testis barrier" en varies espècies de teleostis com *Aphanius dispar* (Abraham *et al.*, 1980), *Poecilia reticulata* (Marcaillou i Szöllösi, 1980; Bergmann *et al.*, 1984), *Ameca splendens* (Bergmann *et al.*, 1984) i *Oryzias latipes* (Shibata i Hamaguchi, 1986). Aquests estudis han determinat que aquesta barrera està composta per unions fortes entre les cèl·lules de Sertoli adjacents que envolten les cèl·lules germinals donant lloc als cists germinals. L'objectiu de la realització del següent experiment era demostrar l'existència d'una barrera similar tant en mascles com en les

estructures que emmagatzemen espermatozoides en les femelles de l'espècie en estudi.

El protocol es duu a terme en diversos dies consecutius:

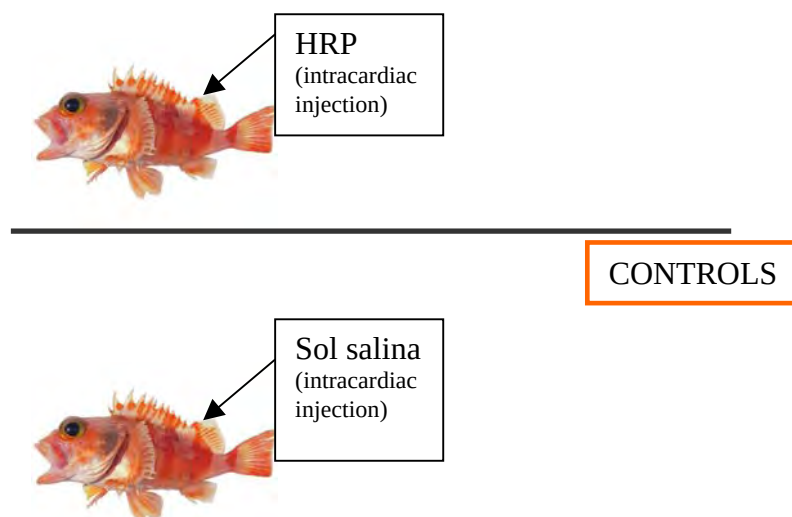
DIA 1

Es preparava el PBS barrejant 150 ml de la solució A i 500 ml de la solució B:

Solució A= $0,1\text{M NaH}_2\text{PO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ Solució B= $0,1\text{M Na}_2\text{HPO}_4 \times 12\text{H}_2\text{O}$,
obtenint una solució final amb un pH=7,2.

Preparem també una solució de NaCl (0,7%) i guardem les solucions a la nevera a 4°C fins l'endemà.

DIA 2



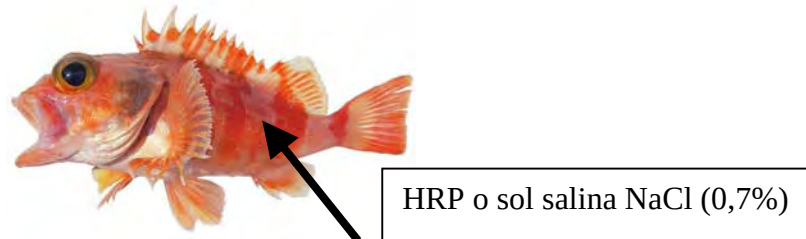
S'utilitzaven 0,15 mg de solució HRP per cada gr. de pes corporal de l'espècimen. Si un exemplar feia uns 100 gr. li injectàvem 15 mg d'HRP (100 µl) Cada pot d'HRP conté 28 gr. Es barrejaven 200 µl de sol salina (NaCl 0,7%) amb el contingut del recipient d'HRP i aquesta era la solució que s'injectava després a l'exemplar.

Per anestesiari espècimen s'utilitzava Ethyl 3-aminobenzoate methanesulfonate salt dissolt en aigua marina. Un cop anestesiàt s'injectava la solució d'HRP.

Si l'espècimen pesava entre 200 i 300 gr., li injectàvem un pot de HRP barrejat amb 200 µl de solució salina.

Per la injecció s'usaven xeringues d'1ml: 0,45 x 13 mm TERMO.

Assegurant-nos que no existia oxigen dins la xeringa s'injectava la solució a la vena caudal, tal i com mostra l'esquema :



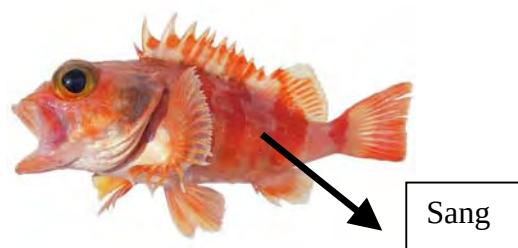
En cada experiment s'utilitzaven 2 exemplars d'entre 200 i 300 gr. cada un i s'injectaven 200 µl molt a poc a poc a cada un.

Un cop fet aquest pas es deixaven els peixos en una galleda amb aigua marina i un oxigenador a fi d'aconseguir les millors condicions pels individus.

En referència al control, si aquest era més gran de 300gr. se li injectaven 500 µl de solució salina a la vena caudal. Es marcava com a control i es deixava també en aigua marina i oxigenador.

Tan els individus experiment com el control s'anaven controlant periòdicament i 8 h després de la injecció d'HRP es procedia a l'extracció de sang. Per aquest pas requeríem de: 6 Eppendorfs, 3 xeringues (0.65 x 25mm, 23^G x1"), 3 vials amb Bouin rotulats, una balança, un ictiòmetre i les pertinents eines de dissecció.

S'anestesiava l'individu amb Ethyl 3-aminobenzoate methanesulfonate salt i s'extreia la sang pertinent: 2 eppendorfs de cada individu punxant a la vena caudal.



Pel que fa a les mostres de sang es centrifugaven 15' a 12000g/min., a 4°C i es posava el sèrum en eppendorfs, guardant-los a 4°C.

A continuació es sacrificava l'individu i s'extreien les gònades, per tal de processar les mostres per ser observades al microscopi òptic o electrònic segons convingués.

Per la microscopia òptica es tallaven les gònades en trossets petits i es deixaven en Bouin a t^a ambient tota la nit. El protocol seguit per a l'anàlisi ultraestructural es detalla a l'apartat que segueix sobre la metodologia general utilitzada per aquests tipus d'estudis.

DIA 3:

Després de la fixació amb Bouin (tota la nit a t^a ambient) els trossets de gònada es rentaven amb PBS (0,1M, pH= 7.2-7.4) a 4°C fent un primer rentat a les 9:00 h, un segon rentat a les 14:00 h i un últim rentat a les 19:00 h.

DIA 4:

En el quart dia es sotmetien els talls de gònada a una sèrie de deshidratació a 4°C: alcohol 70° (30'), alcohol 90° (30'), alcohol 100° (15' dos cops), realitzant aquests dos últims canvis a temperatura ambient.

Després es posaven en gradetes de filferro i s'etiquetaven amb llapis en un tros petit de paper per procedir a la següent sèrie: Es feien dos passos Etanol 1: Butanol 1 de 15 minuts cada un i després un pas Etanol 1: Butanol 3 també de 15 minuts. Tot seguit dos passos de Butanol 1 de 15 minuts cadascun i s'introduïen les mostres en una mescla Creosote 1: Xylol 4, s'esperava que precipitessin i es comptaven 10 minuts. A continuació es feia un pas de Xilol de 10 minuts i un pas Xilol 1: Parafina 1 de 15 minuts. La parafina usada és de baixa temperatura de fusió, entre 46-48 °C, perquè sinó l'HRP s'inactiva. I finalment es fan 4 canvis de parafina de 15 minuts cada un.

Un cop fets aquests passos es confeccionaven els blocs de parafina.

DIA 5:

En el darrer dia es tallaven els blocs en seccions d'uns 6 µm de gruix , 2 o 3 de seriat, 2 files a cada portaobjectes i es deixaven assecar en una placa calefactora a 58 °C.

Es rotulaven degudament cada un dels portaobjectes i es procedia a preparar el tampó 0,25M Tris- 0,1N HCl assolint un pH de 7,7 afegint l'HCL 1N necessari. Després es posava el tampó en una proveta per enrasar amb aigua destil·lada fins als 500 ml. D'aquests, se'n separaven 100 ml en un vas de precipitats petit.

Un cop fet es posava durant 5' la gradeta en aigua destil·lada i després dins el tampó.

Passats una minuts s'hidrataven els talls amb la següent sèrie: Xilol (15'), xilol (15'), alcohol 100° (5'), alcohol 100° (5'), alcohol 96° (5'), alcohol 70° (5'), aigua corrent (10') i H₂Od (10').

Llavors es preparava la solució de DAB:

-2.0 mg DAB	}	Solució 1
-10 ml tampó Tris-HCl		
-0,1ml H ₂ O ₂	}	Solució 2
-10 ml tampó Tris		

La gradeta que estava dins H₂Od la submergíem en el vas amb 400ml de tampó Tris-HCl i es barrejava amb una mosca durant 5-10'.

De la solució de DAB mesclàvem 0,1ml de la sol.2 a la proveta amb la sol.1 i vortejàvem bé.

Un cop fet això trèiem un dels portaobjectes, n'assecàvem les vores, el posàvem en una cambra humida i s'hi abocaven 100µl de sol. DAB. Es deixava actuar entre 5-10'. Aquest procediment es repetia amb tots els portaobjectes.

A continuació es posaven els portaobjectes de nou a la gradeta i s'introduïa aquesta en un vas de precipitats amb H₂Od i una mosca per barrejar.

Per acabar se sotmetia als talls a la següent sèrie de deshidratació: alcohol 70° (2'), alcohol 96° (2'), alcohol 100° (5'), alcohol 100° (5'), creosote-xilol (3-5'), xilol (3-5'), xilol (3-5') es muntaven els portaobjectes amb Bàlsam del Canadà i es rotulaven.

Per acabar només quedava observar els talls sota el microscopi electrònic.

Reactius:

- HRP: SIGMA: P8250 5.000 units Lot 031K74711 28gr. Type II: Form Horseradish (Es conserva a 4°C)
- ETHYL 3-AMINOBENZOATE METHANESULFONATE SALT: SIGMA A5040-25G 065K3681
- CREOSOTE: KANTO CHEMICAL, Cat. N° 07452-01)
- TRIS ULTRA PURE, GIBCO BRL cat n°:15504-012, Lot n°:1000774. 500g.
- HCL. WAKO. 080-0166. 500ml.

Totes les seccions histològiques obtingudes van ser observades al microscopi òptic de camp clar Olympus Bx40. Per a les microfotografies es va utilitzar una pel·lícula de tungstè per a diapositiva en color 160 ASA.

*** DAPI:**

Per tal de visualitzar amb certesa la localització dels nuclis embrionaris es procedí a tenyir les mostres de fluid ovàric amb un colorant amb afinitat nuclear el colorant DAPI o el colorant hoestcht.

Els embrions eren tenyits amb 5 µg/ml de 4',6-diamidine-2-phenylidole-dihydrochloride (DAPI) en PBS 0,1% Triton X-100, on el PBS (Phosphate Buffer Saline) es preparava amb Na₂HPO₄ 77 mM, NaH₂PO₄ 23 mM, CaCl₂ 0,12 mM.

El procediment de tinció era molt simple: es dipositava una gota del colorant al costat de la gota de fluid ovàric i sota la lupa es barrejaven les dues gotes. Un cop fet es posava el cobreobjectes i s'observava sota el microscopi de fluorescència.

*** Hoescht:**

Aquest colorant, igual que l'anterior, permet la tinció dels nuclis embrionaris, però en aquest cas es tracta d'un colorant que penetra més fàcilment dins les

cèl·lules i se sol usar en mostres que no es tenyeixen correctament amb el colorant DAPI.

El protocol aquí també era molt senzill: s'utilitzava un eppendorf on s'hi dipositava el fluid ovàric i s'hi abocaven uns 50 µl de colorant Hoescht 33258. Es barrejava amb un vòrtex i es posava la mescla en un portaobjectes còncav amb una làmina cobreobjectes al damunt. Tot seguit s'observava sota el microscopi de fluorescència.

Amb aquest colorant poden existir problemes de sobretinció degut a l'elevada permeabilitat de les membranes a aquest colorant. Per tant, aquesta tècnica s'utilitzava exclusivament en els casos en els que el colorant DAPI no donava bons resultats.

Les mostres de fluid ovàric també eren observades en el microscopi amb la tècnica de Normansky.

2.2.5 Mètodes d'anàlisi immunohistoquímica:

➤ Estudi de la proliferació cel·lular per PCNA ("Proliferating cell nuclear antigen"):

Aquesta tècnica s'utilitzà per a detectar en quines zones de l'epiteli ovàric existia una major proliferació cel·lular.

L'antigen nuclear de proliferació cel·lular (PCNA) és una proteïna nuclear no histònica d'uns 36 KDa que forma part de la DNA polimerasa δ (Miyachi *et al.*, 1978; Tan *et al.*, 1986; Prelich *et al.*, 1987) i que té un paper clau en la replicació i reparació del DNA (Waga i Stillman, 1994). S'expressa en el nucli, mostrant una expressió màxima en les fases S i G2 del cicle cel·lular (Hall *et al.*, 1990). Aquesta tècnica permet detectar cèl·lules en totes les fases actives del cicle cel·lular (Foley *et al.*, 1991) de manera que és més sensible que no els mètodes tradicionals que són específics de la fase S (Ortego *et al.*, 1995).

Els blocs de parafina foren seccionats amb un gruix d'uns 5 µm i es processaren seguint el següent protocol:

Es desparafinaven els talls amb xilol (3 canvis de 5' cada un) i es rehidrataven amb la sèrie alcohòlica decreixent següent: 2 x 100°, 2 x 96°, 1 x 70° (canvis de 5' cada un). Llavors es rentaven els portaobjectes amb PBS (Phosphate Buffer Saline) (tampó fosfat salí, tampó fosfat 10mM, clorur sòdic 140 mM, pH 7,2) durant 5' i es bloquejava la peroxidasa endògena amb peròxid d'hidrogen (H_2O_2) al 3% durant 10' a temperatura ambient.

Passat aquest temps es rentaven les seccions en PBS fent tres canvis de 5' cada un.

Degut a l'emascament que generen els fixadors sobre els antígens, abans de realitzar la immunomarcació, es va procedir a recuperar-los amb un mètode "retrival". Es van submergir els talls en una solució de citrat sòdic (1,47 g en 500 ml d'aigua milliQ a pH 6), i es va escalfar en un microones a 800 W de potència durant 9-10' (ha de bullir durant 1 o 2'). Tot seguit es deixà refredar durant 30'.

A continuació es feia un rentat en aigua milliQ i es bloquejaven els llocs inespecífics d'unió amb PBS amb 1% de sèrum de cabra ("normal serum") durant 15'.

Un cop fet es procedia a incubar les seccions tota la nit amb l'anticòs primari per PCNA (anticòs monoclonal de rata PC10 anti-PCNA; Chemicon international Inc., USA i Canada) en una dilució 1:200 en tampó PBS amb 1% de sèrum.

Llavors es rentaven les seccions amb PBS (3 canvis de 5' cada un).

Per a la detecció de l'anticòs primari es va utilitzar un kit de detecció: "Immunoperoxidase Secondary Detection System" de la Chemicon International, USA i Canada.

S'incubaven els talls amb els anticossos secundaris de cabra contra l'anticòs de ratolí IgG i contra l'anticòs de conill IgG, diluït en PBS durant 10' a temperatura ambient.

Es feien 3 rentats en TBS (tampó TRIS salí) de 5' cada un i s'incubaven els portaobjectes amb Estreptoavidina HRP diluïda amb tampó TBS a temperatura ambient durant 10'.

Es rentava amb TBS (3 canvis de 5' cadascun) i es revelaven les marques en una solució de 3,3' diaminobenzidina i peròxid d'hidrogen diluïts en TBS. Les

seccions van ser revelades durant uns 10', sempre sota la observació constant sota el microscopi òptic. Un cop revelades, s'aturà la reacció rentant els talls en aigua milliQ.

Seguidament es procedia al contrastat de les mostres amb Hematoxilina de Mayer durant 1' i es rentaven en TBS i després en aigua milliQ.

Finalment es realitzava el muntatge amb Aquatex.

Per tal de comprovar l'eficàcia de la tècnica es van fer controls negatius que van ser tractats amb PBS amb 1% de sèrum, en comptes de l'anticòs primari.

Reactius:

- Tampó PBS: 10 mM de tampó fosfat i 140 mM de NaCl, a pH 7,2): es prepara una solució deu vegades concentrada (10x) barrejant 32,73 g de NaCl, 5,34 g de Na_2HPO_4 i 1,555 g de NaH_2PO_4 en 100 ml d'aigua milliQ. Just abans de ser utilitzat es dilueix la solució a una solució 1x.

2.2.6 Mètodes d'anàlisi ultraestructural:

En el processament de les mostres destinades a l'estudi ultraestructural es seguí el protocol descrit per Robards i Wilson (1993) :

1. Fixació: Les mostres fresques es fixaren immediatament després d'obtenir-les, en una barreja de paraformaldehid 2% - glutaraldehid 2,5% amb tampó cacodilat 0,1M. Un cop fixades 2h a 4°C es van fer 2 rentats de 2 h cadascun amb tampó cacodilat 0,1M. Finalment es deixaven les mostres amb tampó cacodilat tota la nit.

Per les mostres destinades a testar la idoneïtat del fixador utilitzat i descartar possibles artefactes produïts per una mala fixació s'utilitzà un fixador hipotònic i un d'hipertònic:

*Prefixació hipotònica: (448 mOsm)

Es fixaven les mostres amb Glutaraldehyd al 2,5% (0,5ml al 25%), i com a tampó el tampó cacodilat 0.1M (1.25ml de 0.4M), enrasant al final fins a un volum de 10 ml.

*Prefixació habitual: (742 mOsm)

En aquest cas s'utilitzava una barreja de Paraformaldehyd al 2% (1ml al 20%) i Glutaraldehyd al 2.5% (1ml al 25%), amb el tampó cacodilat 0.1M (2.5ml de 0.4M). Seguidament s'enrasava fins a un volum de 10ml.

*Prefixació hipertònica: (1532 mOsm)

La barreja constava de Paraformaldehyd al 4% (2ml al 20%) i Glutaraldehyd al 2.5% (1 ml al 25%) amb tampó cacodilat 0.2M (5ml de 0.4M) com a element tamponador. El volum final de la mescla prefixadora també fou de 10 ml.

Osmolaritat mesurada per punt crioscòpic SCT-UB dia 01/06/2005.

2. Post-fixació: Es realitzava en Osmi a l'1% en tampó cacodilat, a 4°C durant 1 h. Posteriorment es rentaven les mostres en tampó cacodilat 0,1M.

3. Deshidratació: Aquesta es dugué a terme seguint la sèrie acetònica següent: acetona 50° (10'), acetona 70° (2 canvis de 10' cada un), acetona 90° (tres canvis de 10' cada un), acetona 96° (tres canvis de 10' cada un), acetona 100° (tres canvis de 10' cada un).

4. Imbibició i inclusió: Les mostres foren incloses en resina SPURR seguint la sèrie següent: Spurr-acetona100° 1 : 3 (2 h), Spurr-acetona100° 2 : 2 (2 h), Spurr-acetona100° 3 : 2 (3-4 h), Spurr (2-5 h), Spurr (tota la nit), i l'endemà, Spurr (2 h).

A continuació les mostres es transferien a uns motlles de silicona plens de resina Spurr tenint en compte la seva orientació. Es deixava polimeritzar la resina durant 48 h a l'estufa a 60°C i fora l'estufa durant unes 2-3 h.

5. Piramidat: El piramidòtom que es va utilitzar era de la marca Leica Reichert ultratrim del servei de microscopia de la UdG.

6. Obtenció dels semifins: Es feien seccions d'1 μm de gruix amb l'ultramicrotòtom Reichert (Austria) model OM U2 amb una ganiveta de vidre també al servei de microscopia de la UdG. Posteriorment aquests talls eren tenyits amb blau de metilè, i s'observaven al microscopi òptic Leica DMR-XA. La finalitat d'aquests talls era localitzar les zones més interessants per tal de ser observades al microscopi electrònic posteriorment.

7. Ultramicrotomia: Un cop escollida la zona d'interès, es repiramidava el bloc i es feien talls ultrafins d'entre 60 i 90 nm. Els blocs es tallaren amb el mateix ultramicrotòtom citat anteriorment, però en aquest cas amb una ganiveta de diamant Diatome 45.

8. Contrastat: Els talls ultrafins es van contrastar amb acetat d'uranil durant 30' a les fosques i amb citrat de plom durant 10' (Reynolds, 1963) en presència de NaOH. L'NaOH s'utilitzava per captar el CO_2 atmosfèric i així evitar l'aparició de precipitats de carbonat de plom que es formen quan interaccionen el citrat de plom i el CO_2 .

Reactius:

- Fixador: Barrejar 25 ml de paraformaldehid al 8%, 10 ml de glutaraldehid al 25% i 50 ml de tampó cacodilat 0,2 M a pH 7,4. Enrasar amb aigua destil·lada fins a 100 ml.
- Tampó cacodilat 0,2M, pH 7,4: Posar 2,14 g en 50 ml d'aigua destil·lada. Afegir-hi HCl fins aconseguir el pH desitjat.
- Acetat d'uranil 2% aquós: Afegir 0,1 g en 5 ml d'aigua destil·lada i deixar dissoldre uns 30'.
- Citrat de plom (Reynolds, 1963): Afegir 1,33 g de $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$, 1,76 g de $\text{Na}_3(\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7) \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ en 30 ml d'aigua destil·lada. Agitar durant 30' i posteriorment afegir-hi 8 ml d'NaOH 1 N. Enrasar amb aigua destil·lada bullida fins a 50 ml.

Finalment els talls eren examinats en un microscopi electrònic de transmissió Zeiss EM-910 del Servei de Microscopia de la Universitat de Girona. Per a les microelectrografies es va usar la pel·lícula Kodak Electron Microscope Film ref. 4489, especial per a microscopia electrònica.

➤ **Estudi ultraestructural de les mostres marcades amb HRP:**

Pel protocol de les mostres per ser observades amb el microscopi electrònic el procediment seguit fou l'utilitzat per Lou i Takahashi (1989) i és el següent:

Es tallaven les gònades en talls de mida inferior a 1 mm^3 i es fixaven durant 3h en una barreja de glutaraldehid 2% i paraformaldehid 2,5% en tampó cacodilat-sodi 0,1M (pH 7,2). Un cop fixats els talls eren rentats varies vegades amb el mateix tampó de la fixació i deixats en ell tota la nit.

Al dia següent els talls de gònada s'incubaven a temperatura ambient durant 30' en una mixtura formada per 0,02% DAB en tampó Tris-HCl 0,05M. A continuació s'incubaven els talls en la mateixa barreja afegint-hi H_2O_2 0,003% durant 1h i es postfixaven en tetraòxid d'osmi 1% (1h, 4°C). El següent pas era incloure els talls en resina Epoxy i tallar els blocs amb una ganiveta de vidre. La observació es realitzava també en el microscopi electrònic de transmissió Zeiss EM-910 del Servei de Microscopia de la Universitat de Girona.

2.2.7 Mètodes d'observació d'embrions:

Per tal de determinar quina metodologia era la menys agressiva i més adequada per a la observació d'embrions de l'espècie en estudi es van testar diferents tècniques de preservació.

- ✓ Unes mostres foren fixades directament en formol 10%. Després d'unes 2 setmanes les mostres es traslladaven a un bidó al 4% on es deixaven aproximadament una setmana més abans de procedir a la seva observació.

- ✓ Una altra tècnica experimental per conservar embrions fou congelar tot el fluid ovàric de les femelles madures (gràvides) directament a -20°C tan bon punt era extret.
- ✓ També es procedí a observar les mostres de fluid ovàric fresques directament sota el microscopi òptic, sense tractar les mostres amb cap mena de reactiu.
- ✓ Algunes de les mostres foren observades amb la tècnica d'Interferència de Contrast Normansky (NIC) o també coneguda com microscopia d'interferència diferencial de contrast (DIC). Aquesta tècnica és una il·luminació de la microscopia òptica que incrementa el contrast en mostres transparents no tenyides. La DIC es basa en el principi de la interferometria per guanyar informació sobre la densitat òptica de la mostra per tal de veure caràcters invisibles. La imatge que s'obté és similar a l'obtinguda pel microscopi de contrast de fase però sense l'halo de difracció. El resultat és una imatge d'aparença tridimensional que correspon a la variació de densitats de la mostra.
- ✓ Diverses mostres fresques foren tenyides amb un colorant nuclear (DAPI o Hoescht) per evidenciar els nuclis de les cèl·lules pertanyents a l'embrió.
- ✓ D'altres mostres foren fixades per ser observades al microscopi electrònic de transmissió.

Fixació: Les mostres fresques es fixaren immediatament després d'obtenir-les, en una barreja de paraformaldehid 2% - glutaraldehid 2,5% amb tampó cacodilat 0,1M. Un cop fixades 2h a 4°C es van fer 2 rentats de 2 h cadascun amb tampó cacodilat 0,1M. Finalment es deixaven les mostres amb tampó cacodilat tota la nit.

Post-fixació: Es realitzava en Osmi a l'1% en tampó cacodilat, a 4°C durant 1 h. Posteriorment es rentaven les mostres en tampó cacodilat 0,1M.

Deshidratació: Aquesta es dugué a terme seguint la sèrie acetònica següent: acetona 50° (10'), acetona 70° (2 canvis de 10' cada un), acetona 90° (tres canvis de 10' cada un), acetona 96° (tres canvis de 10' cada un), acetona 100° (tres canvis de 10' cada un).

Imbibició i inclusió: Les mostres foren incloses en resina SPURR seguint la sèrie següent: Spurr-acetona100° 1 : 3 (2 h), Spurr-acetona100° 2 : 2 (2 h), Spurr-acetona100° 3 : 2 (3-4 h), Spurr (2-5 h), Spurr (tota la nit), i l'endemà, Spurr (2 h).

A continuació les mostres d'embrions es transferien a uns motlles de silicona plens de resina Spurr tenint en compte la seva orientació. Es deixava polimeritzar la resina durant 48 h a l'estufa a 60°C i fora l'estufa durant unes 2-3 h.

Piramidat: El piramidòtom que es va utilitzar era de la marca Leica Reichert ultratrim del servei de microscopia de la UdG.

Obtenció dels semifins: Es feien seccions d'1 µm de gruix amb l'ultramicrotòtom Reichert (Austria) model OM U2 amb una ganiveta de vidre també al servei de microscopia de la UdG. Posteriorment aquests talls eren tenyits amb blau de metilè, i s'observaven al microscopi òptic Leica DMR-XA. La finalitat d'aquests talls era localitzar els ous individuals per tal de ser observats al microscopi electrònic posteriorment.

Ultramicrotomia: Un cop escollida la zona d'interès, es repiramidava el bloc i es feien talls ultrafins d'entre 60 i 90 nm. Els blocs es tallaren amb el mateix ultramicrotòtom citat anteriorment, però en aquest cas amb una ganiveta de diamant Diatome 45.

Contratat: Els talls ultrafins es van contrastar amb acetat d'uranil durant 30' a les fosques i amb citrat de plom durant 10' (Reynolds, 1963) en presència de NaOH. L'NaOH s'utilitzava per captar el CO₂ atmosfèric i així evitar l'aparició de precipitats de carbonat de plom que es formen quan interaccionen el citrat de plom i el CO₂.

3. RESULTATS I DISCUSSIONS

3. RESULTATS I DISCUSSIONS:

3.1. MASCLES: ESTRUCTURA TESTICULAR, ESPERMATOGÈNESI I CICLE ANUAL:

3.1.1. Resultats:

En aquest apartat ens proposem analitzar l'estructura testicular i el procés d'espermatogènesi que presenta *H. d. dactylopterus*. Al mateix temps, també estudiarem el cicle reproductiu dels mascles a partir de diferents tipus d'anàlisi: els canvis macroscòpics i histològics que pateixen els testicles, així com les variacions mensuals de diversos índexs relacionats amb la reproducció.

✓ 3.1.1.1 Estructura testicular:

Macroscòpicament els testicles presenten l'aparença de dues estructures allargades, d'un color marronós clar (Fig.1). La major part de l'any apareixen com estructures més o menys planeres amb una secció transversal lleugerament triangular. Les dues gònades es mantenen unides dorsalment mitjançant una capa de teixit mesentèric negrós, teixit que també les manté sostingudes a la part dorsal de la cavitat abdominal. De cada un dels testicles en surt un conducte que discorre entre la bufeta urinària i l'intestí, desembocant a través d'una obertura o gonoporus de la papil·la urogenital situat entre el porus urinari i l'anus.

Cada gònada consta d'un conducte espermàtic principal que s'estén al llarg de la seva part dorsal (Fig. 2). És en aquest conducte on s'anirà acumulant l'esperma, que serà visible com una zona més blanquinosa a la part laterodorsal de cada un dels testicles (Fig. 3). L'epiteli que delimita aquest conducte està constituït per una capa de cèl·lules columnars (Fig. 4). Aquestes cèl·lules estan polaritzades i presenten 2 dominis de membrana diferents. En la seva part apical tenen un citoplasma molt vacuolitzat i algunes vesícules de secreció, i en la seva part basal trobem el nucli (Fig 4a). Ultraestructuralment, es detecta sovint un Aparell de Golgi molt evident en el citoplasma (Fig. 5).

La paret testicular que recobreix externament el testicle està formada per una capa de teixit connectiu a la part més interna, i una capa d'epiteli visceral a la cara externa, tal i com també s'observa a la citada figura 4. A la mateixa figura s'evidencien els nombrosos vasos sanguinis que es troben immersos en el teixit connectiu.

L'organització bàsica dels testicles és la comuna en tots els peixos i la resta de vertebrats, presentant un compartiment germinal i un compartiment intersticial, separats per una membrana basal.

A nivell d'estructura interna, en els teleostis el compartiment germinal pot ser de dos tipus: lobular o tubular anastomat. En el tipus lobular el compartiment germinal està organitzat en lòbuls cecs que acaben a la perifèria del testicle, mentre que en els testicles de tipus tubular el compartiment germinal apareix com una xarxa de túbuls anastomats. En el nostre cas, l'estructura del testicle és lobular, de manera que està format per un conjunt de lòbuls seminífers amb un extrem cec a la perifèria de la gònada i un altre extrem que desemboca als conductes eferents. Aquests són els encarregats de recol·lectar l'esperma produït a l'interior dels lòbuls i de transportar-lo fins al conducte espermàtic, on desemboquen. És precisament en aquest conducte, i en situació laterodorsal, on es van acumulant els espermatozoides fins al moment de la còpula. En un primer moment, l'esperma produït es concentra en la zona anterior del conducte (veure Fig. 2), i quan la quantitat d'espermatozoides és ja molt important, fet que es dona cap a la tardor, l'acumulació d'esperma ocupa tota la longitud de la gònada i és especialment abundant a la part més posterior dels testicles.

L'estroma interlobular està compost per cèl·lules de Leydig, vasos sanguinis i fibres musculars, encarregats de donar suport al lòbuls (Figs. 6, 7). Les cèl·lules de Leydig (Fig. 8) són allargades i presenten un nucli ovalat, amb nuclèol i cromatina perifèricament condensada. El seu citoplasma conté molts ribosomes lliures, reticle endoplasmàtic llis, mitocondris amb crestes tubulovesiculars, uns pocs lisosomes i alguns grànuls electrodensos. En determinades èpoques de l'any, sobretot en la fase de post-posta, aquestes cèl·lules solen estar acompanyades de granulòcits (Fig. 9).

Dins els lòbuls podem trobar un gran nombre de cèl·lules germinals en diferents estadis, depenent del moment del cicle reproductor en el que ens trobem. L'espermatogènesi de l'espècie objecte d'estudi és cística (Mattei *et al.*, 1993): els cists germinals mantenen les cèl·lules sexuals masculines en desenvolupament fins al final de la seva maduració, moment en el que els cists s'obren i alliberen els espermatozoides al lumen lobular. Així doncs, tot el procés d'espermatogènesi es dona en el que anomenem cists espermatogènics: les extensions citoplasmàtiques de les cèl·lules de Sertoli engloben les cèl·lules germinals formant els espermatocists, els quals constitueixen la unitat funcional del testicle (Fig. 10).

L'estadi inicial d'aquesta unitat és una única espermatogònia primària que és envoltada per unes quantes cèl·lules de Sertoli que, alhora, estan en contacte amb la membrana basal que separa el compartiment germinal del compartiment intersticial del testicle. A mesura que es dona el procés d'espermatogènesi, les cèl·lules de Sertoli van envoltant la cohort de cèl·lules germinals que es desenvolupen sincrònicament a partir d'aquesta espermatogònia primària.

Les espermatogònies es troben sempre a la perifèria dels lòbuls i, a mesura que el procés d'espermatogènesi avança, l'augment de mida del cist produït per la multiplicació de les cèl·lules germinals provoca l'ocupació de l'interior del lòbul.

Ultraestructuralment, les cèl·lules de Sertoli tenen un nucli basal, mitocondris amb crestes lamel·lars, túbuls de reticle endoplasmàtic llis i rugós, i ribosomes lliures (Fig. 11). Aquestes cèl·lules estan unides entre elles per interdigitacions i nombrosos desmosomes localitzats bàsicament a la zona apical d'aquestes cèl·lules (Fig. 12). A mesura que el cist augmenta de mida, degut a les divisions cel·lulars de les cèl·lules germinals que conté, la paret que formen les cèl·lules de Sertoli esdevé més prima. Després del trencament del cist i l'alliberament dels espermatozoides madurs al lumen lobular, les cèl·lules de Sertoli que formaven el cist s'hipertrofien i es converteixen en cèl·lules columnars unides entre sí per nombroses interdigitacions i desmosomes tot recobrint la llum del lòbul (Fig. 13). En aquesta fase apareixen alguns vacúols heterofàgics amb cossos residuals en degradació en el seu interior.

Mitjançant l'experiment amb el traçador HRP (Horseradish Peroxidase) s'intentà investigar l'existència de l'anomenada "blood-testis barrier", una barrera que formen

les cèl·lules de Sertoli gràcies a les unions adherents que estableixen entre elles. La funció d'aquesta barrera és la de crear un microambient diferenciat i protegir les cèl·lules sexuals masculines en desenvolupament enfront agents externs o cèl·lules immunològiques que podrien atacar-les. Malgrat que l'elevat nombre d'unions intercel·lulars detectades entre les diferents cèl·lules de Sertoli recolzen l'existència d'aquesta barrera, la demostració absoluta mitjançant aquesta tècnica immunohistoquímica al microscopi òptic no és concloent. Ara bé, en les mostres tractades pel microscopi electrònic sí que s'intueix que el traçador HRP avança només fins a certes zones (Fig. 14), sempre pròximes a cists amb cèl·lules sexuals masculines en desenvolupament.

✓ 3.1.1.2 Espermatogènesi:

Dins els testicles es produeix l'esperma mitjançant el procés anomenat espermatogènesi. A partir de les espermatogònies es donen diferents cicles cel·lulars per tal d'augmentar la població de cèl·lules germinals i així proporcionar el gran nombre de cèl·lules requerides per la fertilització. Aquest procés es divideix en tres fases principals, tal i com Selman i Wallace (1986) van descriure: l'espermatocitogènesi, la meiosi i l'espermioogènesi. L'espermatocitogènesi és el procés pel qual les espermatogònies, englobades dins d'un cist delimitat pel citoplasma de les cèl·lules de Sertoli, es divideixen mitòticament per formar espermatòcits primaris.

Després de la proliferació mitòtica les cèl·lules germinals entren en la fase de meiosi, que comprèn dos cicles cel·lulars especialitzats. Durant el primer, el DNA es duplica i la informació genètica es recombina en els espermatòcits primaris. Aquests es divideixen per donar lloc als espermatòcits secundaris que es divideixen ràpidament sense duplicació del DNA, així que aquestes cèl·lules surten de la meiosi com espermàtides haploides. Aquestes últimes són més petites i sofreixen (sense més proliferació cel·lular) una reestructuració cel·lular cap a espermatozoides flagel·lats, procés anomenat espermioogènesi. La durada total d'aquest procés ve determinada pel genoma de les cèl·lules germinals (França *et al.*, 1998).

En aquest apartat s'han realitzat anàlisis histològiques i ultraestructurals dels diferents estadis de desenvolupament de les cèl·lules sexuals masculines, amb l'objectiu d'identificar possibles particularitats relacionades amb el mode de reproducció de l'espècie en estudi.

- Espermatocitogènesi:

Les espermatogònies primàries solen aparèixer en petits grups localitzats sempre a prop de la perifèria del lòbul, envoltades individualment per les cèl·lules de Sertoli que formaran el cist. Les podem trobar al llarg de tota la longitud del lòbul. Són les cèl·lules germinals més grans, amb una morfologia ovalada i un nucli, normalment en posició central, de mida considerable i amb un nuclèol força evident. La cromatina nuclear és poc homogènia i de naturalesa granular (Fig. 15). Al citoplasma hi trobem una quantitat notable de mitocondris (a vegades agregats), diversos complexos de Golgi, abundant reticle endoplasmàtic llis i algunes lamel·les anellades.

Pel que fa a les espermatogònies secundàries, aquestes cèl·lules tenen una forma més arrodonida i es troben ja agrupades dins del cist delimitat per cèl·lules de Sertoli (Fig.16). Estan en major nombre que les espermatogònies primàries i, a vegades, s'observen ponts intercel·lulars que les interconnecten com a resultat d'una citoquinesis incompleta.

Els mitocondris no són tan nombrosos com en l'estadi anterior, però continuen essent un dels orgànuls més evidents. En el citoplasma hi trobem també Aparell de Golgi, reticle endoplasmàtic llis i ribosomes. En el nucli, segons l'etapa en la que es trobin, la cromatina es pot trobar més o menys condensada.

Ni les espermatogònies primàries ni les secundàries resultaren tenyides quan s'utilitzà la lectina *Triticum vulgaris* (WGA).

- Meiosi

Els espermatòcits primaris són la següent fase del desenvolupament de les cèl·lules sexuals masculines. Es formen quan les espermatogònies secundàries

repliquen el seu material genètic i entren en la profase de la meiosi. La mida del nucli és similar a la de l'estadi anterior, però la seva forma pot variar al llarg de la profase. La cromatina està heterogèniament condensada i en alguns nuclis s'hi intueix un nuclèol de forma difusa. Aquest estadi s'evidencia per la progressiva compactació de la cromatina i la formació dels complexos sinaptonèmics (Fig. 17). Aquests complexos es distingeixen en l'estadi de zigotè prop l'embolcall del nucli i van penetrant cap al centre i s'acaben de formar en l'estadi de paquitè. En el citoplasma els mitocondris són de mida lleugerament més gran que en l'estadi anterior, i el reticle endoplasmàtic llis continua essent molt abundant. En alguns casos podem observar ponts intercel·lulars entre varies d'aquestes cèl·lules (Fig. 18).

Pel que fa al següent estadi de desenvolupament, els espermatòcits secundaris, són cèl·lules de mida inferior, amb un nucleoplasma més condensat que l'estadi anterior i amb un nucli més petit. Aquest tipus cel·lular és difícil de detectar perquè el temps entre la primera i la segona divisió mitòtica és molt curt.

Tampoc en aquests estadis les cèl·lules sexuals masculines resultaren tenyides amb la lectina *Triticum vulgaris* (WGA) (Fig. 19).

- Espermiogènesi

A les fases inicials de l'estadi d'espermatida, el parell de centríols migren cap a la membrana plasmàtica, migració que està s'acompanya per un moviment dels mitocondris cap aquesta zona per tal d'envoltar el futur flagel (Fig. 20). Seguidament el complex centriolar s'ancora a la membrana plasmàtica i dóna lloc al flagel. En aquest complex, el centríol proximal està situat obliquament al centríol distal, i aquest últim, ancorat per fibres radials i diferenciat en el que anomenem cos basal, es manté unit a la membrana plasmàtica.

Seguidament es dóna la formació del canal citoplasmàtic degut al moviment del parell de centríols cap al nucli, arrossegant amb aquest desplaçament la membrana plasmàtica, a la que estan ancorats, i el segment inicial del flagel (Fig. 21). Al mateix temps, es produeix una evident reducció del volum nuclear com a

conseqüència de la progressiva i evident condensació de la cromatina. Aquest fet provoca canvis en l'aparença del nucli, mostrant una cromatina organitzada en "grumolls" (Fig. 22). Aquesta aglomeració de la cromatina no és uniforme, sinó que en un principi és més intensa en la regió central del nucli (Fig. 23). Aquesta condensació acaba provocant que el nucli prengui forma de "U" (Fig. 24). No obstant, en la zona del complex centriolar sempre existeix una zona de cromatina menys condensada (veure figura 26).

El patró de condensació de la cromatina deixa un gran espai al nucli ja que la membrana nuclear no s'ha reduït (Fig. 25). Així que, posteriorment, és molt probable que es doni un procés de vesiculació per tal d'eliminar les restes de material nuclear. Algunes vesícules de doble membrana que observem prop del nucli semblen haver estat extreïdes de la membrana nuclear sobrant. Mitjançant aquest procés la membrana nuclear acaba delimitant quasi perfectament la cromatina condensada.

En referència a la disposició dels centríols, aquesta pateix alguns canvis des de les espermatides inicials fins als espermatozoides madurs. En els estadis inicials de l'espermioogènesi, els centríols proximal i distal són oblics entre ells (Fig. 26). Cal recalcar, per altra banda, que en l'estadi d'espermàtida els centríols estan envoltats per una substància amorfa que potser estabilitza i reforça la unió entre el complex centriolar i el nucli.

A mesura que el procés d'espermioogènesi avança, els centríols esdevenen més i més ortogonals, tot i que en l'espermatozoide final no són perfectament perpendiculars, sinó que formen un angle més petit que 90° (Fig. 27). Com a resultat de la inserció lateral del diplosoma, en l'espermatozoide final la fossa nuclear està situada a un lateral del nucli, de manera que la inserció del flagel al nucli no és central (Fig. 28), sinó que està situat obliquament, a una banda d'aquest.

Amb l'avanç de l'espermioogènesi, els mitocondris que estaven concentrats a la zona flagel·lar, es disposen entorn el primer segment del flagel, donant lloc a la peça mitja del futur espermatozoide, que ja en l'estadi d'espermàtida consta de 4

capas de mitocondris (veure Fig. 25). Aquests mitocondris mostren crestes tubulars força regularment disposades.

En el cas de les espermatides, la tinció amb la lectina *Triticum vulgaris* (WGA), tampoc no va provocar-los cap canvi de color.

Al final de l'espermioogènesi el citoplasma residual ha estat quasi totalment eliminat, i els processos citoplasmàtics de les cèl·lules de Sertoli que delimiten els cists desapareixen, alliberant així els espermatozoides madurs cap al lumen dels lòbuls seminífers.

L'espermatozoide d'*H. dactylopterus* pertany al "complex type of anachrosomal introperm" (Muñoz *et al.*, 2002b) definit per Jamieson i Leung (1991), i que és típic d'espècies amb fertilització interna. Els caps d'aquests espermatozoides no mostren cap resta de vesícula anacrosòmica, i presenten un nucli amb forma de pera envoltat per una estreta tira de citoplasma sense orgànuls. En l'espècie objecte d'estudi, a més, el nucli forma una protuberància en una banda protegint el diplosoma. (Fig. 29). En la peça mitja de l'espermatozoide, que en l'estadi anterior ja constava de quatre capas de mitocondris, observem que cada una d'elles conté entre 8 i 11 d'aquests orgànuls, variant en funció de l'orientació del tall (Fig. 30). El canal citoplasmàtic és molt evident (Fig. 31) i el flagel mostra la típica estructura axonemàtica 9+2, amb 9 doblets de microtúbuls i un parell de central, tot envoltat per una membrana flagel·lar lleugerament ondulada (Fig. 32). En les parts distal i mitja del flagel s'evidencien dues projeccions laterals de la membrana flagel·lar (veure Fig. 29).

Mentre els espermatozoides estan encara situats a l'interior dels lòbuls testiculars no s'observa cap tret especialment destriable en ells (Fig. 33). Ara bé, els espermatozoides que ja han arribat a la zona posterior del testicle, allà on el conducte espermàtic abandona la gònada, presenten una bossa citoplasmàtica a una banda dels seus caps i peça mitja amb alguns diminuts vacúols al seu interior (Figs. 34, 35). Cal fer esment que l'epiteli d'aquesta àrea del conducte espermàtic mostra nombroses projeccions i vesícules lliures que penetren a l'àrea on els

espermatozoides ja madurs esperen per ser alliberats cap a dins del cos de la femella (Fig. 36).

Els espermatozoides es van acumulant al conducte espermàtic (Fig. 37) on estan organitzats en petits grups o feixos (Fig. 38), i són finalment inseminats en aquest estat dins el tracte reproductor de la femella.

Contràriament a la resta de cèl·lules sexuals masculines de l'interior del testicle, els espermatozoides que ja es troben dins del conducte espermàtic resultaren tenyits amb la lectina *Triticum vulgaris* (WGA). A més, cal destacar que la tinció també tenyí intensament les cèl·lules de les parets del conducte espermàtic de sortida, donant-los una coloració fortament marronosa (Figs. 39, 40).

✓ 3.1.1.3 Cicle anual:

▪ Canvis macroscòpics i histològics dels testicles:

Els testicles recol·lectats entre els mesos de febrer i abril són molt planers i presenten una secció més o menys triangular, amb vores planes o una mica còncaues. En aquesta època els testicles són tous i molt prims (Fig. 41). En el mes de maig les gònades masculines continuen essent planeres, però en el tall transversal ja s'intueix un cert augment de volum degut a la proliferació de les cèl·lules sexuals (Fig. 42).

Entre els mesos de maig i finals de juny s'observa com mica en mica els testicles van augmentant de volum degut al creixement de cèl·lules sexuals masculines al seu interior (Fig. 43). Fixant-nos-hi bé podem intuir l'esperma que es va començant a acumular als conductes espermàtics.

A partir del mes de juliol les seccions testiculars, ara més triangulars i no tant planeres, tenen una aparença homogènia, excepte per petites àrees blanques. És en aquest mes quan podem veure més clarament com augmenta la quantitat

d'esperma produït i emmagatzemat als conductes espermàtics, cada cop més evidents (Fig. 44) .

Entre els mesos de setembre i desembre, la regió dorsal-posterior de cada testicle presenta un aspecte blanquinós causat per l'ompliment dels conductes espermàtics amb esperma, de manera que és perfectament visible macroscòpicament com una línia blanca longitudinal al llarg de la regió dorsal de cada testicle (veure Fig. 45). En aquests mesos finals de l'any al manipular les gònades masculines és quasi inevitable que s'escapi esperma pels conductes de sortida dels testicles. Les seves seccions transversals en aquesta època tenen una forma més arrodonida degut a l'inflament provocat per la important proliferació cel·lular. Durant aquest període els testicles són, doncs, molt més blanquinosos i fràgils, de consistència esponjosa.

La figura 46 mostra els talls transversals de testicles procedents de mascles de mides similars i capturats al llarg de l'any, permetent observar que aquests esdevenen més amples a mesura que s'omplen d'esperma.

Cal remarcar l'enorme quantitat de greix mesentèric detectat a les vísceres dels mascles en els mesos finals de l'any, tal i com es mostra a la figura 47.

- Índexs relacionats amb la reproducció

A més d'observar els canvis que experimenten les gònades al llarg de l'any, també es van calcular diversos índexs relacionats amb la reproducció que ens donen informació complementària: l'índex gonadosomàtic, l'índex hepatosomàtic i el factor de condició.

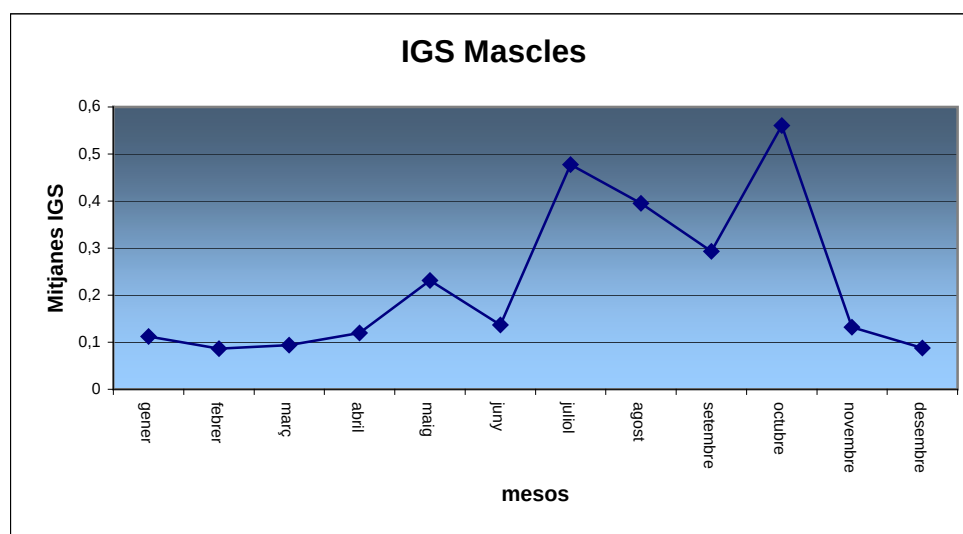
Tot i tenir present que el nombre d'exemplars de què consta l'estudi no és suficient per a realitzar càlculs estadístics acceptables, hem considerat convenient presentar les dades dels exemplars estudiats per tal de comprovar si les tendències en les variacions dels diferents índexs coincideixen amb els treballs previs duts a terme pel nostre grup de recerca.

Així doncs, a continuació es presenten les mitjanes, medianes i desviacions estàndards dels càlculs de l'Index Gonadosomàtic (IGS) (taula 1), l'Índex Hepatosomàtic (IHS) (taula 2), i factor de condició (K) (taula 3) dels mascles analitzats, així com els gràfics corresponents:

Taula 1: Dades mensuals de l'IGS dels espècimens mostrejats:

	N	IGS	MEDIANA	SD
gener	45	0,112	0,126	0,095
febrer	62	0,086	0,094	0,037
març	10	0,094	0,098	0,044
abril	18	0,119	0,119	0,056
maig	12	0,231	0,237	0,279
juny	9	0,137	0,181	0,111
juliol	10	0,478	0,539	0,171
agost	4	0,396	0,469	0,534
setembre	2	0,294	0,293	0
octubre	5	0,561	0,539	0,185
novembre	8	0,132	0,197	0,349
desembre	13	0,088	0,067	0,112
Totals	198			

Gràfic 1: Evolució anual de l'índex gonadosomàtic

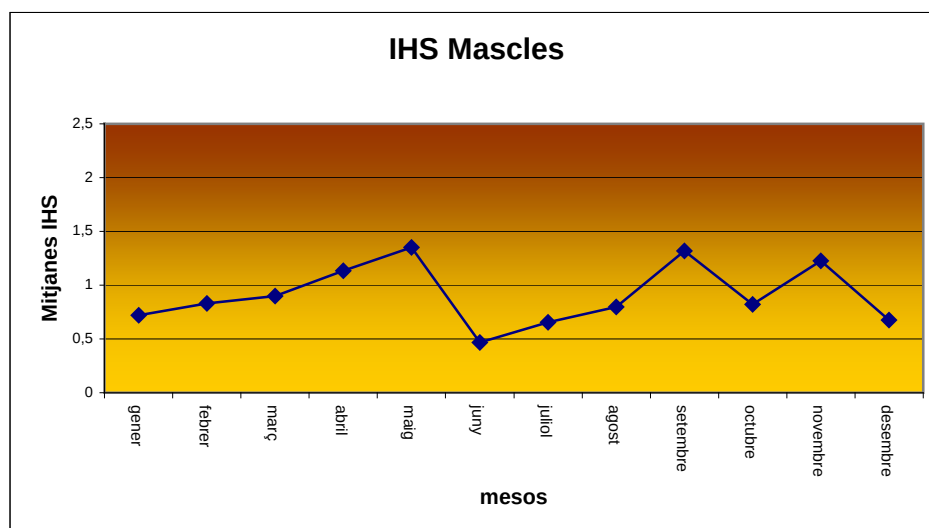


L'índex gonadosomàtic (IGS) presenta un primer petit augment el mes d'abril i es constata un creixement continuat a partir del mes de juny, fins assolir els valors màxims al mes d'octubre. A partir d'aquest moment el pes de les gònades masculines pateix una disminució molt marcada i brusca fins arribar a valors molt baixos, ja al mes de novembre.

Taula 2: Dades mensuals de l'IHS dels espècimens mostrejats:

	N	IHS	MEDIANA	SD
gener	46	0,720	0,753	0,457
febrer	73	0,831	0,839	0,634
març	12	0,898	0,786	0,589
abril	18	1,135	1,112	0,335
maig	12	1,351	1,532	0,426
juny	9	0,469	0,615	0,170
juliol	9	0,656	0,744	0,224
agost	4	0,798	0,913	0,413
setembre	2	1,317	1,317	0
octubre	5	0,820	0,824	0,234
novembre	8	1,225	1,263	0,443
desembre	13	0,677	0,652	0,156
Totals	211			

Gràfic 2: Evolució anual de l'índex hepatosomàtic

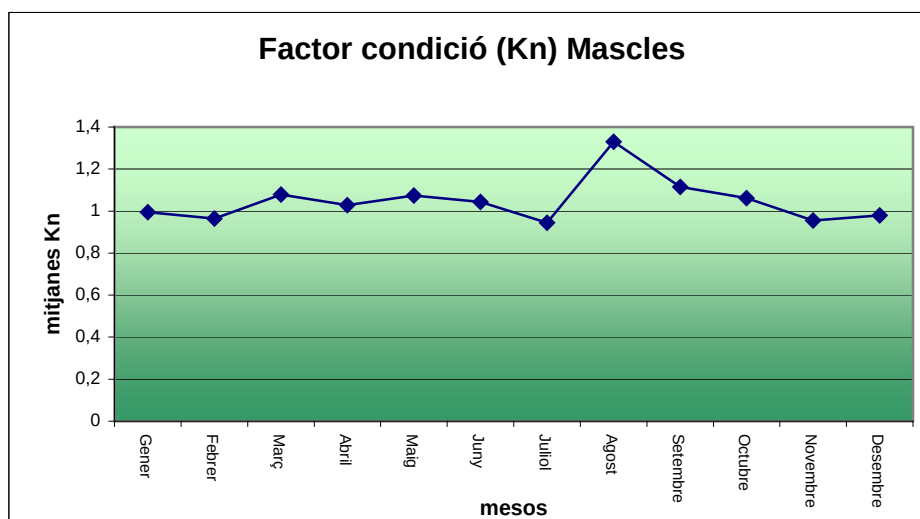


L'índex hepatosomàtic (IHS) presenta valors elevats a la primavera, amb un pic al mes de maig, i retorna a valors baixos fins a principis de tardor, quan el pes relatiu del fetge torna a augmentar.

Taula 3: Dades mensuals del valor Kn dels espècimens mostrejats:

	N	Kn	MEDIANA	SD
gener	46	0,995	0,964	0,133
febrer	73	0,964	0,976	0,173
març	12	1,079	1,019	0,224
abril	18	1,029	1,039	0,096
maig	12	1,075	1,045	0,156
juny	9	1,043	1,103	0,117
juliol	10	0,945	0,954	0,115
agost	4	1,329	1,275	0,662
setembre	1	1,116	1,116	0
octubre	5	1,062	1,043	0,109
novembre	8	0,955	0,919	0,108
desembre	13	0,979	0,974	0,075
Totals	211			

Gràfic 3: Evolució anual del factor de condició (Kn):



Pel que fa al factor de condició (Kn), índex que reflexa l'estat de nodriment dels exemplars, en el cas dels mascles es manté força constant excepte pel pic que detectem el mes d'agost.

- Canvis histològics dels testicles:

Les seccions de les gònades dels exemplars capturats entre els mesos de febrer i abril ens mostren uns testicles formats per evidents lòbuls amb els lúmens buits, a excepció d'algunes espermatogònies en estadis primerencs de desenvolupament i alguns espermatozoides residuals. En aquesta època comença la fase de proliferació d'espermatogònies (Fig. 48).

Durant els mesos de maig i juny el procés d'espermatogènesi provoca que els cists s'omplin de cèl·lules germinals en desenvolupament de manera que no es diferencien tan bé cadascun dels lòbuls individuals. La causa és la proliferació de les espermatogònies, que ha donat lloc a cèl·lules sexuals masculines en tots els estadis de desenvolupament (Figs. 49, 50).

D'aquesta manera, els estadis en els que podem trobar les cèl·lules germinals són: espermatogònia, espermatòcit i espermàtida. En alguna ocasió podem observar petits grups d'espermatozoides lliures al lumen lobular, però és molt poc freqüent.

Des de juliol i fins a l'octubre ja podem trobar tots els estadis de cèl·lules sexuals masculines dins els lòbuls. Apareixen moltes espermàtides i alguns lumens lobulars ja estan plens d'espermatozoides madurs (Figs. 51, 52). Les seves seccions tenen una aparença homogènia, excepte per petites àrees més fosques entre el teixit (Fig. 53). Aquestes zones són acumulacions d'espermatozoides al centre dels lòbuls (Fig. 54) que posteriorment passaran als conductes eferents (Fig. 55).

De novembre a gener tots els lumens lobulars estan plens de cèl·lules sexuals madures, algunes de les quals ja es van acumulant al conducte espermàtic (Fig. 56). També es poden trobar algunes espermatogònies a la perifèria dels lòbuls, a punt per iniciar un nou cicle espermatogènic.

Finalment al març, ja dins la fase de post-posta, els lumens del testicle tornen a estar buits d'espermatozoides i les espermatogònies tornen a augmentar en nombre una altra vegada.

Làmina I: Estructura testicular. Visió macroscòpica

Fig. 1. Aparència externa dels testicles d'*Helicolenus dactylopterus dactylopterus*. Barra= 1cm.

Fig. 2. Visió d'un testicle on s'evidencia el conducte espermàtic en la seva part dorsal. ce: conducte espermàtic. Barra= 1cm.

Fig. 3. Visió dels testicles d'un exemplar capturat el mes d'agost, on es mostra una zona més blanquinoso a la part laterodorsal dels testicles on s'inicia l'acumulació de l'esperma (→).

Làmina I: Estructura testicular. Visió macroscòpica



Làmina II: Estructura testicular. Visió histològica i ultraestructural

Fig. 4. Epiteli del conducte espermàtic. ece: epiteli del conducte espermàtic; ev: epiteli visceral; sz: espermatozoides; tc: teixit connectiu; vs: vas sanguini. Blau de Toluidina. Barra= 50 μ m.

Fig. 4a. Ampliació de les cèl·lules columnars del conducte espermàtic.

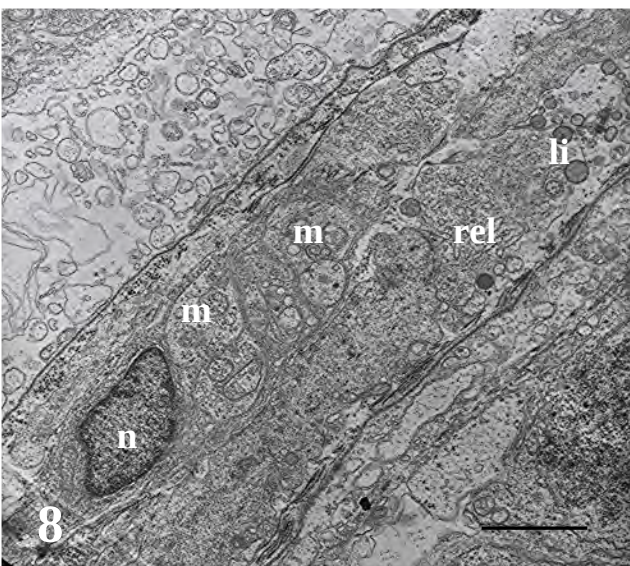
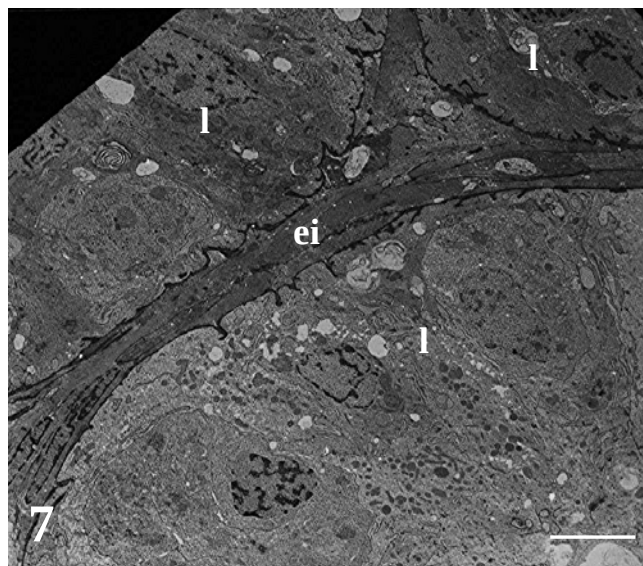
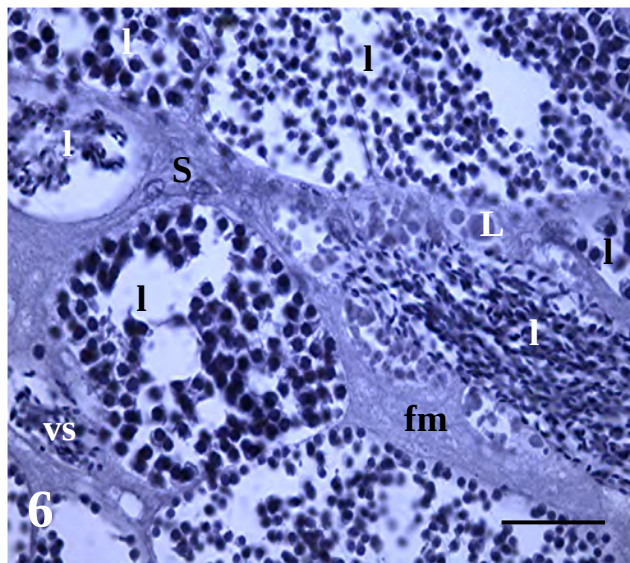
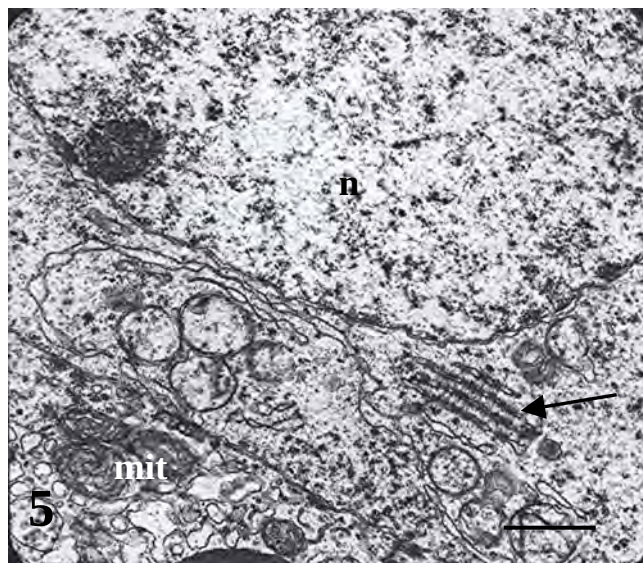
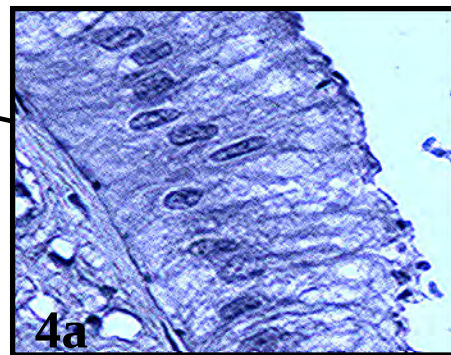
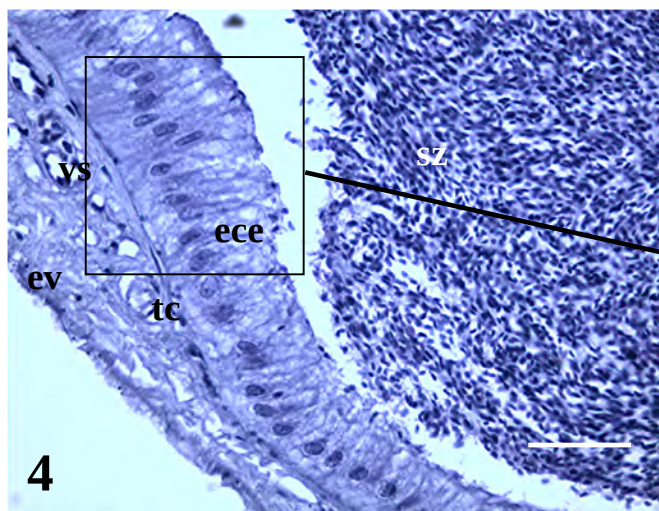
Fig. 5. Ultraestructura d'una cèl·lula epitelial del conducte espermàtic. →: Aparell de Golgi; mit: mitocondris; n: nucli. Barra= 1 μ m.

Fig. 6. Lòbuls testiculars on podem observar els constituents de l'estroma interlobular. f m: fibres musculars; L: cèl·lula de Leidig; l: lòbuls testiculars; S: cèl·lula de Sertoli; vs: vas sanguini. Blau de Toluidina. Barra= 50 μ m.

Fig. 7. Visió al microscopi electrònic de l'estroma interlobular delimitant tres lòbuls testiculars. ei: estroma interlobular; l: lòbul testicular. Barra= 6 μ m.

Fig. 8. Micrografia d'una cèl·lula de Leidig. li: lisosomes; m: mitocondris; n: nucli; rel: reticle endoplasmàtic llis. Barra = 1 μ m.

Làmina II: Estructura testicular. Visió histològica i ultraestructural:



Làmina III: Cèl·lules de Leidig i Cèl·lules de Sertoli

Fig. 9. Granulòcit entorn cèl·lules de Leidig en l'època de post-posta. g: granulòcit; L: cèl·lula de Leidig. Barra= 2 μm .

Fig. 10. Cists espermatogènics delimitats per les cèl·lules de Sertoli. S: cèl·lula de Sertoli; sc: espermatòcits; sd: espermatides; sg: espermatogònies. Blau de Toluidina. Barra= 50 μm .

Fig. 11. Ultraestructura d'una cèl·lula de Sertoli. rel: reticle endoplasmàtic llis; rib: ribosomes; m: mitocondri; n: nucli; nu: nuclèol; v: vesícula. Barra= 1 μm .

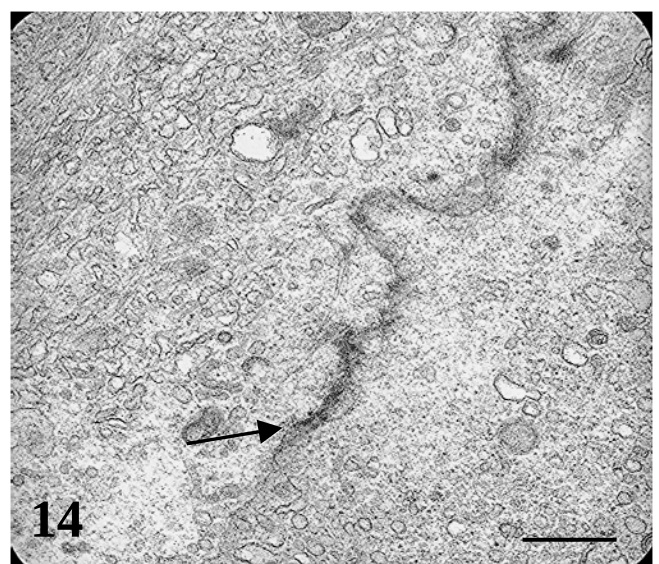
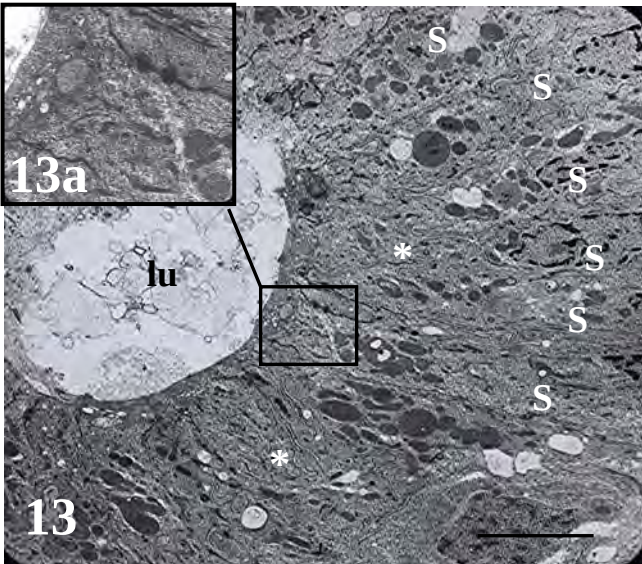
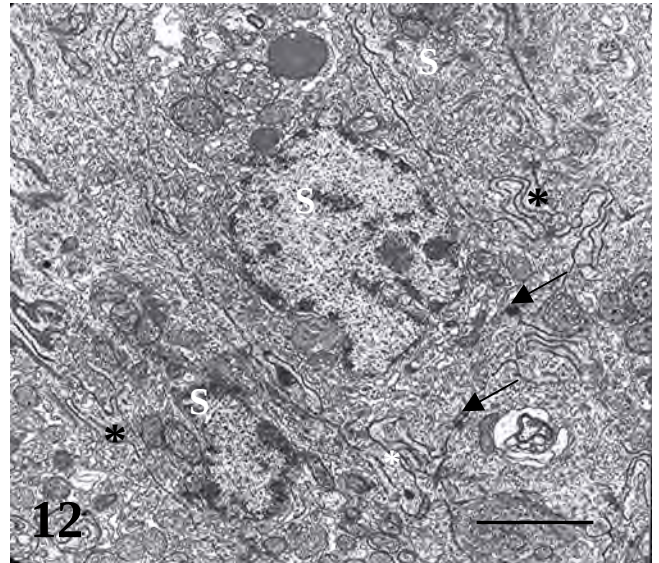
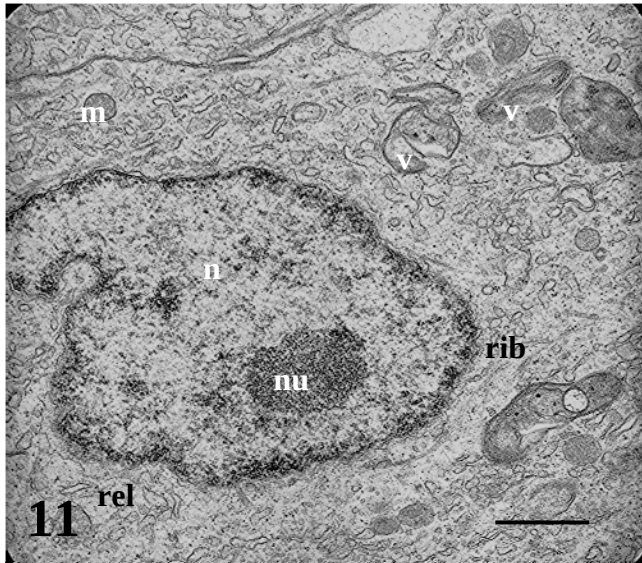
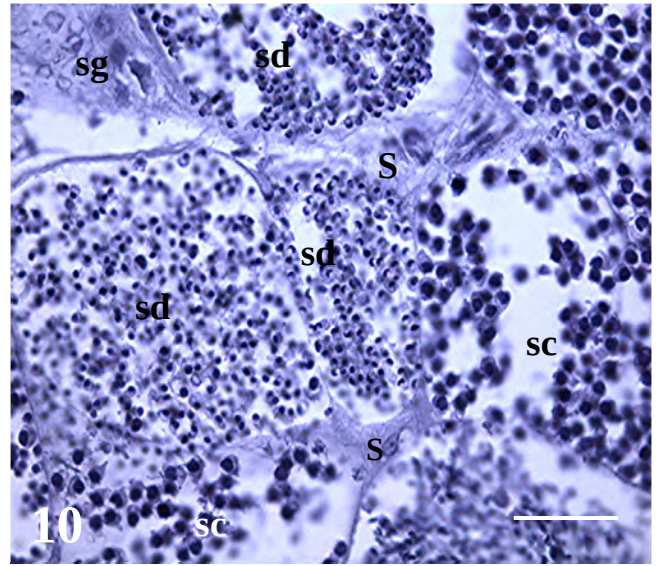
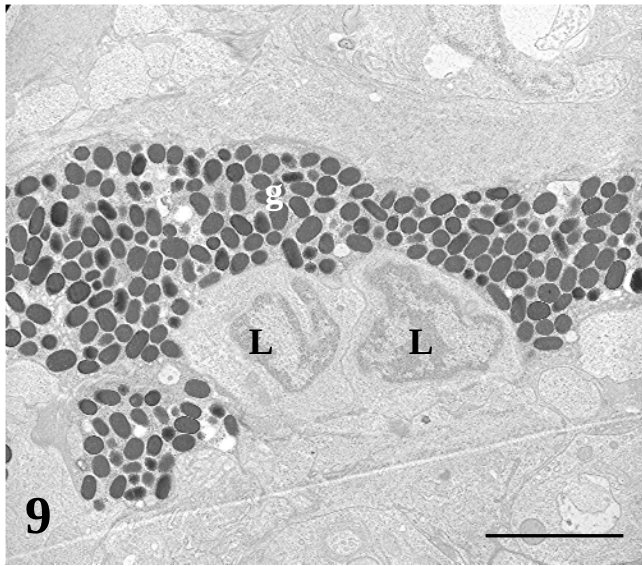
Fig. 12. Diverses cèl·lules de Sertoli unides per interdigitacions i desmosomes. S: cèl·lula de Sertoli; $\rightarrow$: desmosoma; *: interdigitacions. Barra= 2,5 μm .

Fig. 13. Cèl·lules de Sertoli columnars després del trencament dels cists. *: interdigitacions entre cèl·lules de Sertoli adjacents; lu: lumen del lòbul; S: cèl·lula de Sertoli. Barra= 5 μm .

Fig 13a: Detall dels desmosomes que uneixen aquestes cèl·lules.

Fig 14. Electromicrografia de l'experiment amb HRP on s'observa fins on pot avançar el traçador. $\rightarrow$: punt on el traçador ja no avança. Barra= 1 μm .

Làmina III: Cèl·lules de Leidig i Cèl·lules de Sertoli



Làmina IV: Espermatogènesi i Meiosi:

Fig. 15. Estructura d'una espermatogònia primària. m: mitocondris; n: nucli; rel: reticle endoplasmàtic llis; S: cèl·lula de Sertoli; →: desmosoma; *: interdigitacions. Barra= 2,5 µm.

Fig. 16. Micrografia on s'observen dues espermatogònies secundàries que deriven de l'espermatogònia inicial. S: cèl·lula de Sertoli; sg: espermatogònia; *: interdigitacions. Barra= 2 µm.

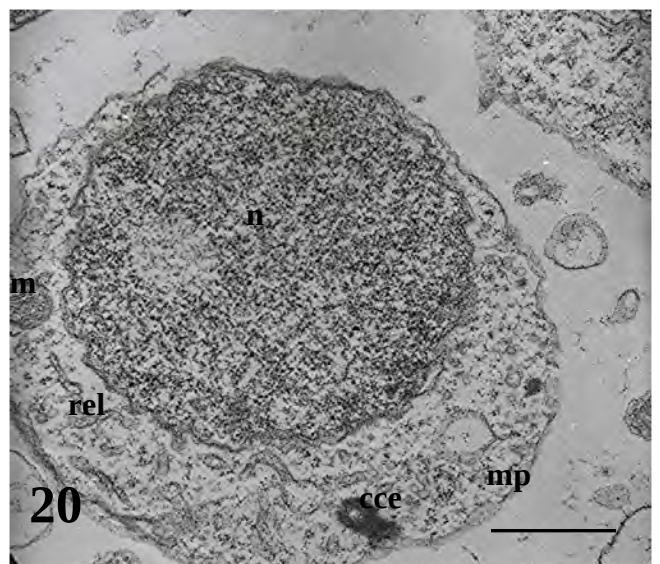
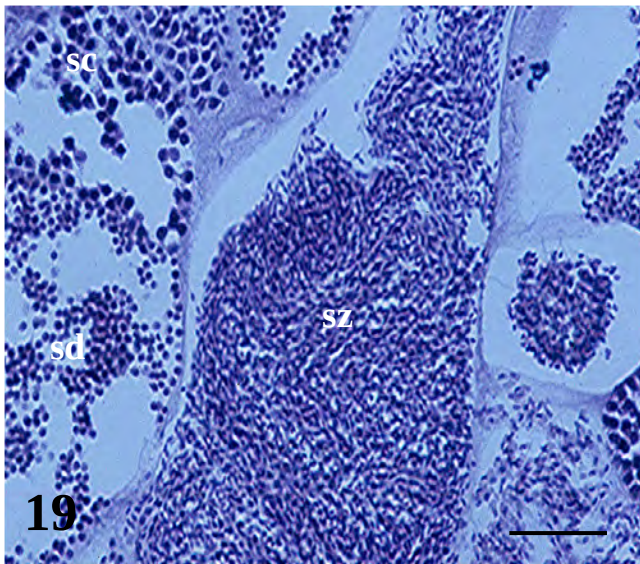
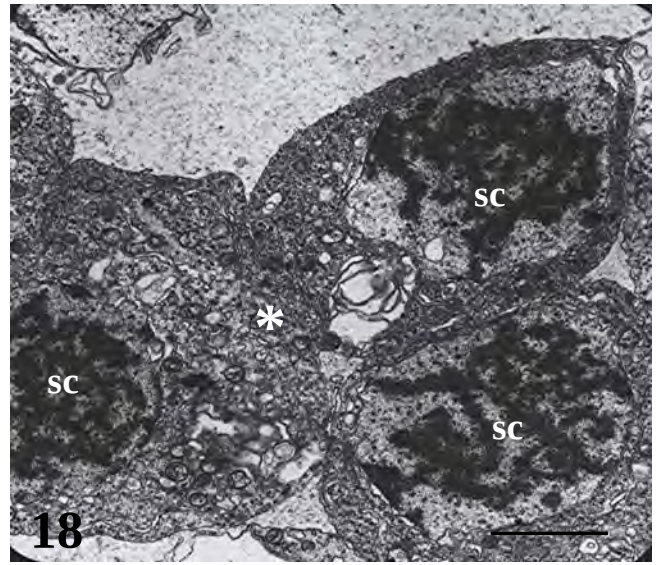
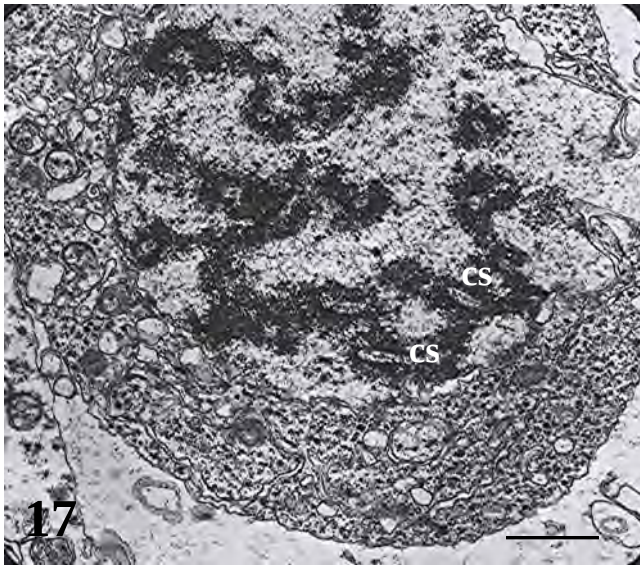
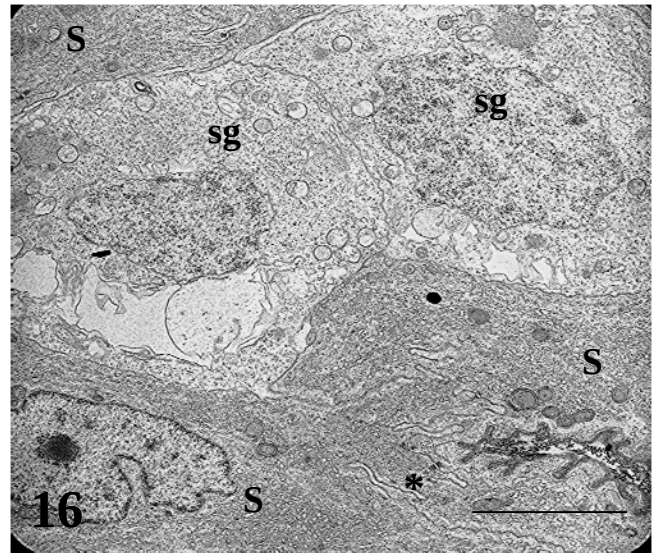
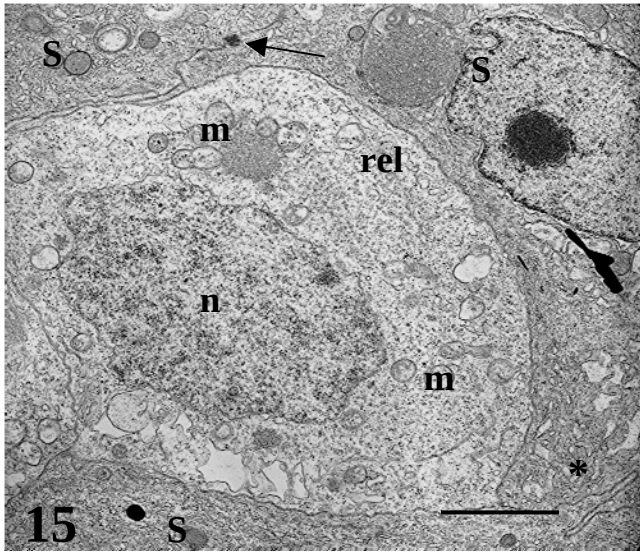
Fig. 17. Espermatòcit primari on s'evidencien alguns complexos sinaptonèmics a l'interior del nucli. cs: complexos sinaptonèmics. Barra= 1 µm.

Fig. 18. Espermatòcits primaris units per ponts intercel·lulars. sc: espermatòcit; *: pont intercel·lular. Barra= 2,5 µm.

Fig. 19. Visió general dels lòbuls testiculars tractats amb la lectina *Triticum vulgaris* (WGA). sc: espermatòcits; sd: espermàtides; sz: espermatozoides. Blau de Toluidina. Barra= 40 µm.

Fig. 20. Espermàtida inicial en la fase de formació del flagel. cce: complex centriolar; m: mitocondris; mp: membrana plasmàtica; n: nucli, rel: reticle endoplasmàtic llis. Barra= 1 µm.

Làmina IV: Espermatogènesi i Meiosi:



Làmina V: Espermiogènesi I. Fases d'espermàtida

Fig. 21. Canal citoplasmàtic d'una espermàtida. c: centríol; cc: canal citoplasmàtic; f: flagel; m: mitocondris; v: vesícules. Barra= 0,5 µm.

Fig. 22. Condensació de la cromatina del nucli de l'espermàtida en forma de grumolls. f: flagel; m: mitocondris; n: nucli. Barra= 1 µm.

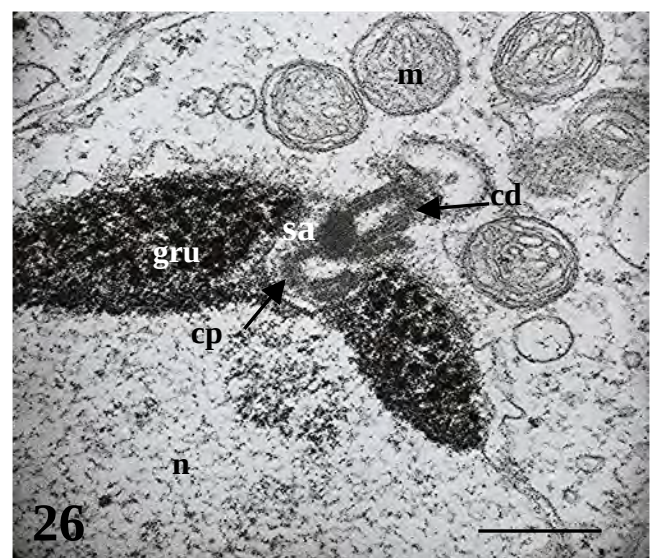
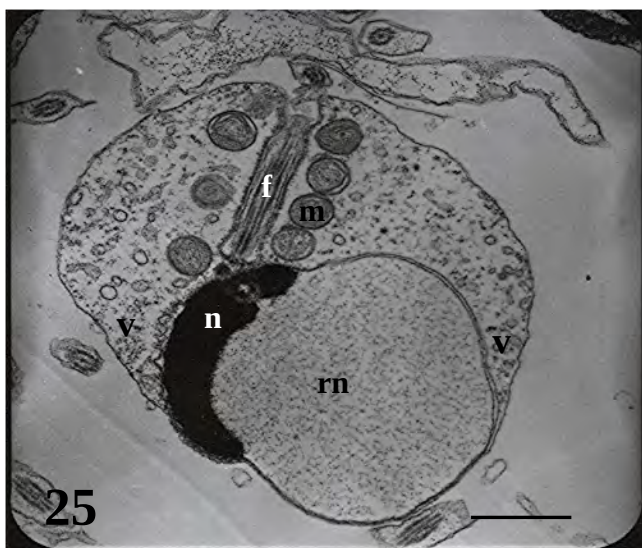
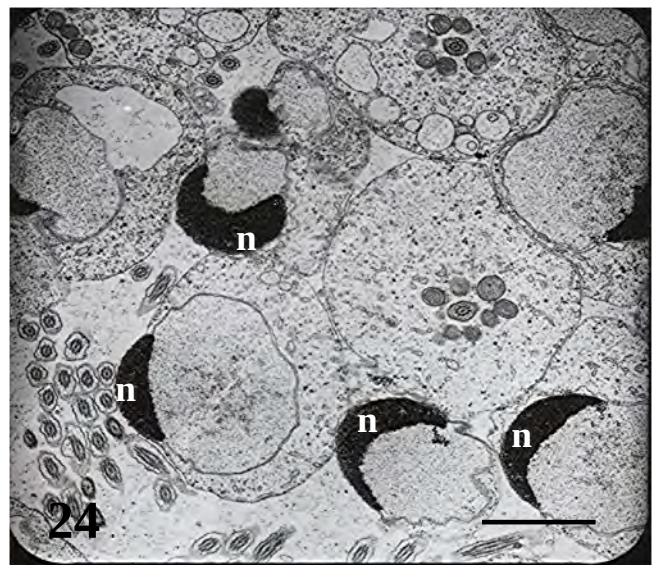
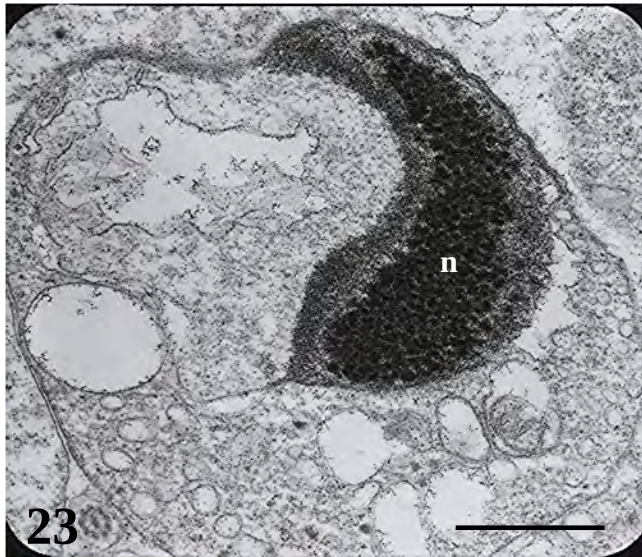
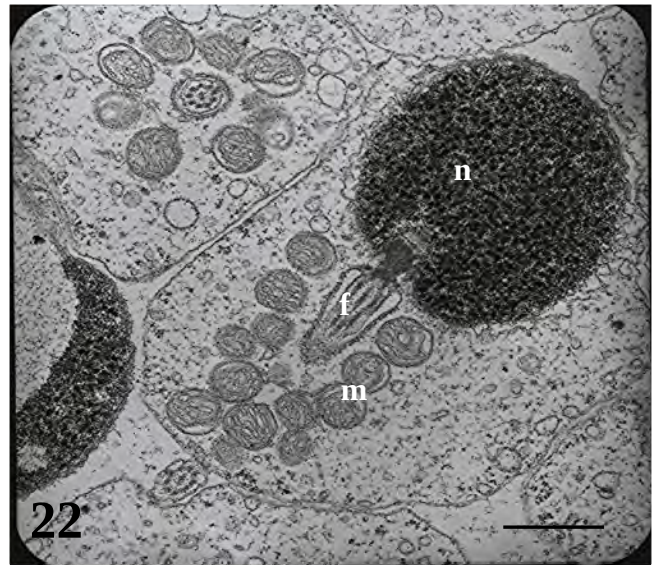
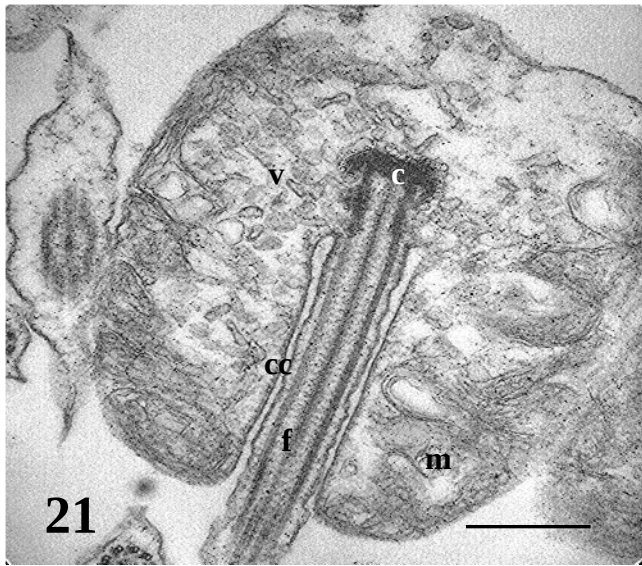
Fig. 23. Micrografia on es mostra que la condensació de la cromatina de les espermàtides és més marcada en el centre del nucli. n: nucli. Barra= 2 µm.

Fig. 24. Espermàtides en les que la condensació de la cromatina els hi ha conferit forma de "U". n: nucli. Barra= 2,5 µm.

Fig. 25. Espermàtida final on s'observa l'enorme volum de material nuclear que s'haurà d'eliminar. f: flagel; m: mitocondris; n: nucli; rn: restes del nucli; v: vesícules. Barra= 1 µm.

Fig. 26. Disposició dels centríols a l'inici de l'espermiogènesi. cd: centríol distal; cp: centríol proximal; gru: grumolls de cromatina; m: mitocondris; n: nucli; sa: substància amorfa. Barra= 0,5 µm.

Làmina V: Espermiogènesi I. Fases d'espermàtida



Làmina VI: Espermiogènesi II. Inserció del flagel i espermatozoides

Fig. 27. Disposició dels centríols en l'estadi final de l'espermiogènesi. cc: canal citoplasmàtic; cd: centríol distal; cp: centríol proximal; f: flagel; m: mitocondri. Barra= 0,2 μ m.

Fig. 28. Micrografia on es mostra la inserció lateral del diplosoma. f: flagel; n: nucli; rn: restes del nucli. Barra= 1 μ m.

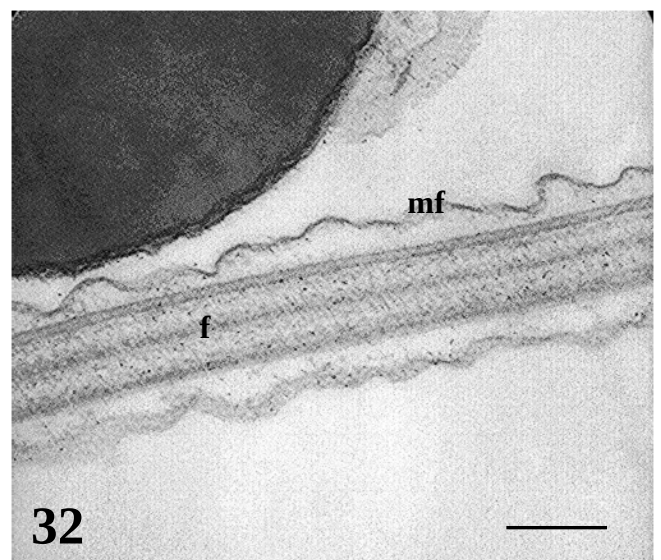
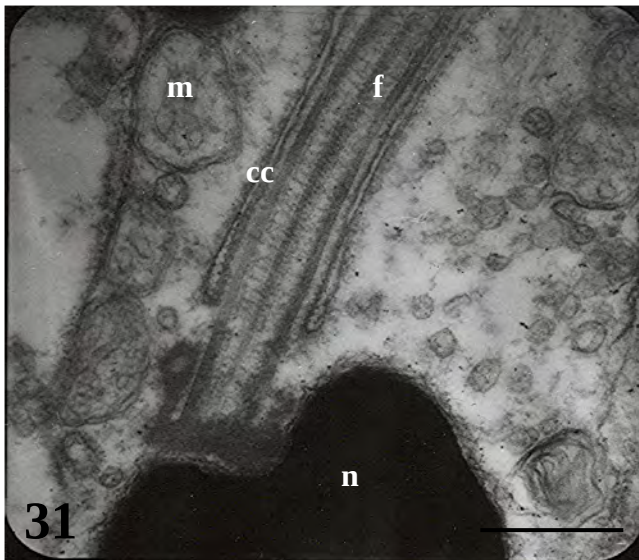
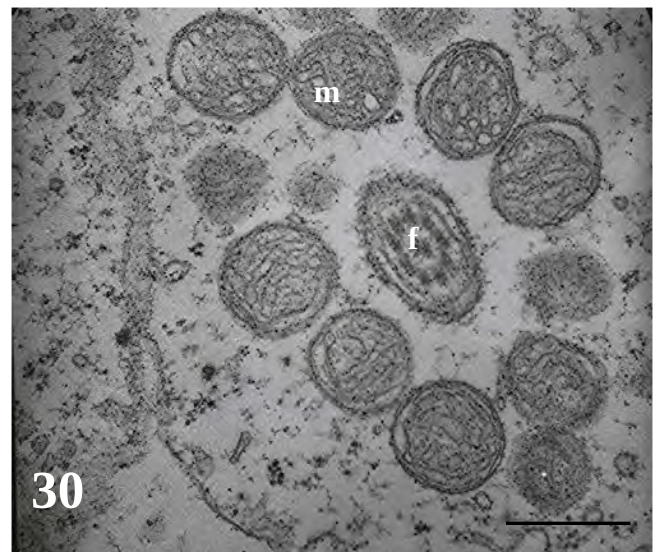
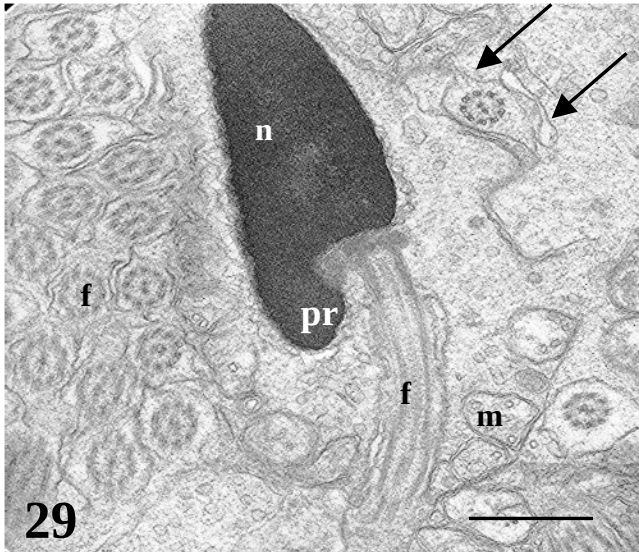
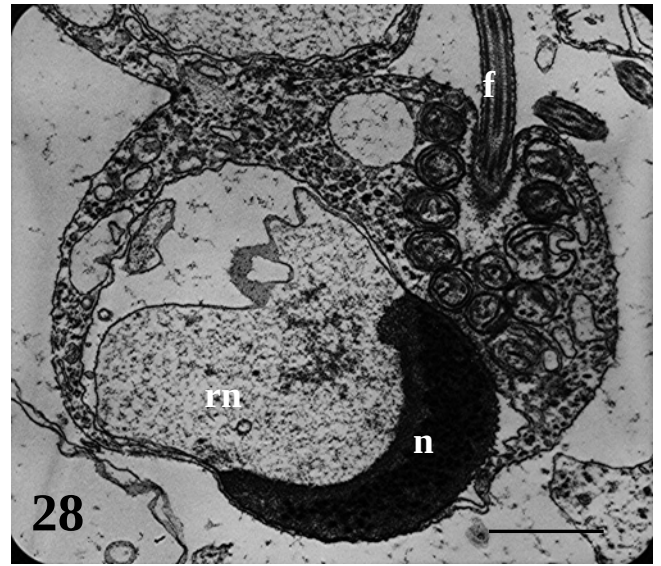
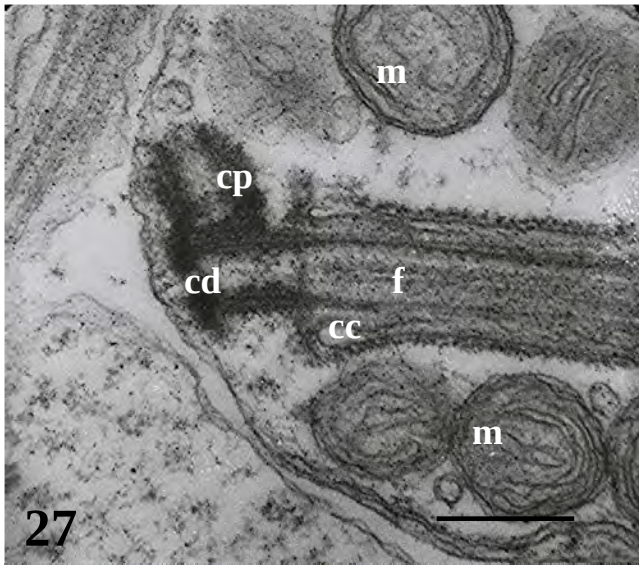
Fig. 29. Espermatozoide d'*Helicolenus dactylopterus dactylopterus*. f: flagel espermatozoide; m: mitocondris; n: nucli; pr: protuberància del nucli; $\rightarrow$: projeccions laterals del flagel. Barra= 0,5 μ m.

Fig. 30. Tall transversal d'un espermatozoide on s'observen els 11 mitocondris que formen una de les capes de la peça mitja. f: flagel; m: mictocondri. Barra= 0,25 μ m.

Fig. 31. Imatge al micoroscopi electrònic on podem observar clarament el canal citoplasmàtic a banda i banda del flagel. cc: canal citoplasmàtic; f: flagel; m: mitocondris; n: nucli. Barra= 0,2 μ m.

Fig. 32. Secció longitudinal del flagel on podem observar que la membrana flagel·lar és lleugerament ondulada. f: flagel; mf: membrana flagel·lar. Barra= 0,5 μ m.

Làmina VI: Espermiogènesi II. Inserció del flagel i espermatozoides



**Làmina VII: Espermatozoides en conductes. Formació de la bossa
citoplasmàtica**

Fig. 33. Espermatozoides dins un lòbul testicular. Barra= 2,5 µm.

Fig. 34. Espermatozoides en el conducte espermàtic que mostren clarament una bossa citoplasmàtica entorn els caps. bc: bossa citoplasmàtica. Barra= 2,5 µm.

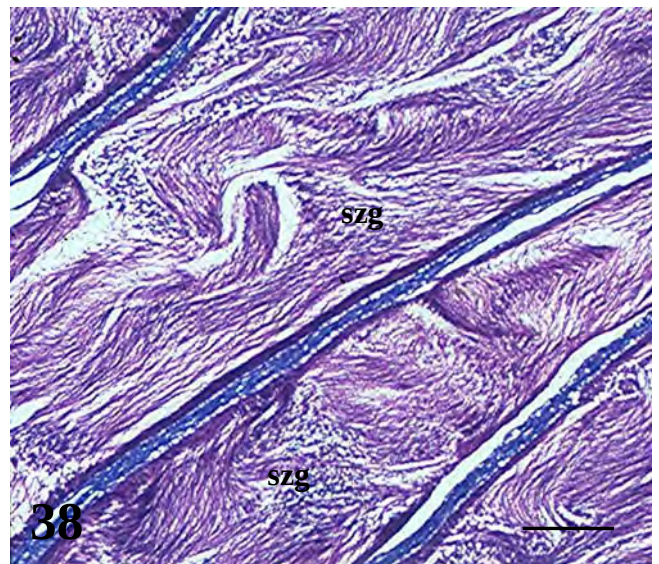
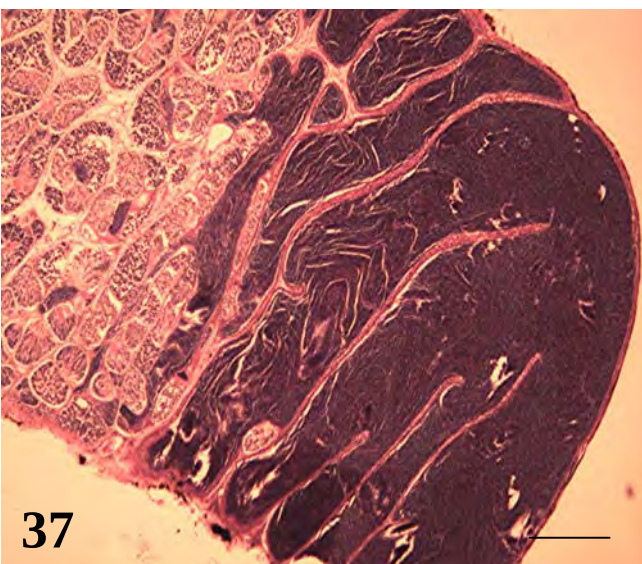
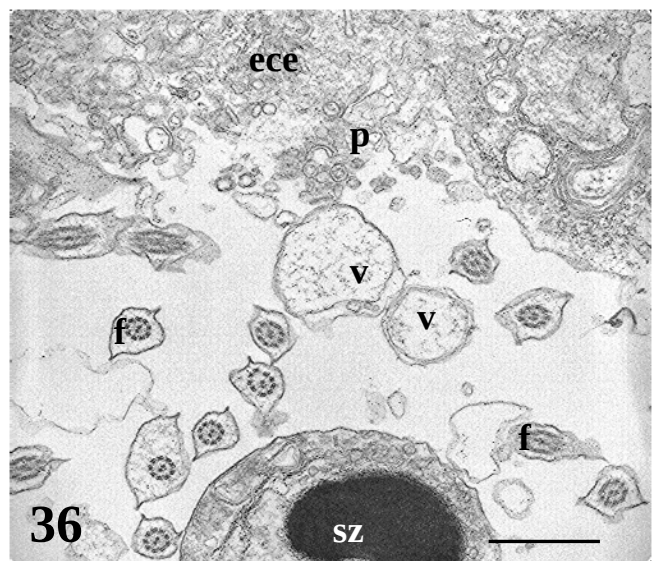
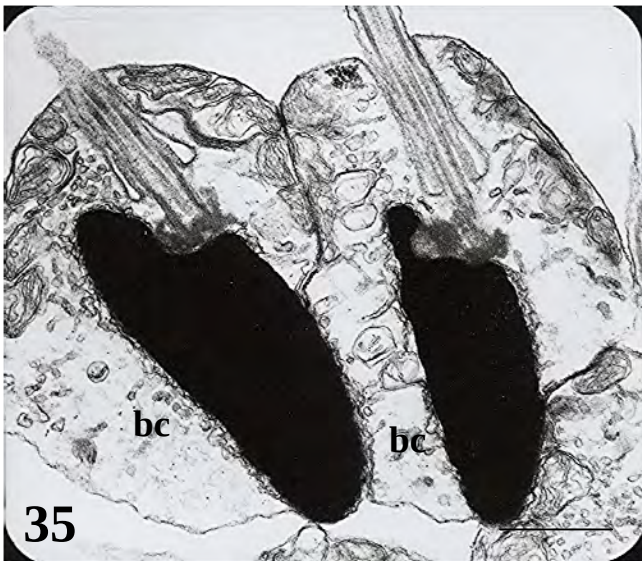
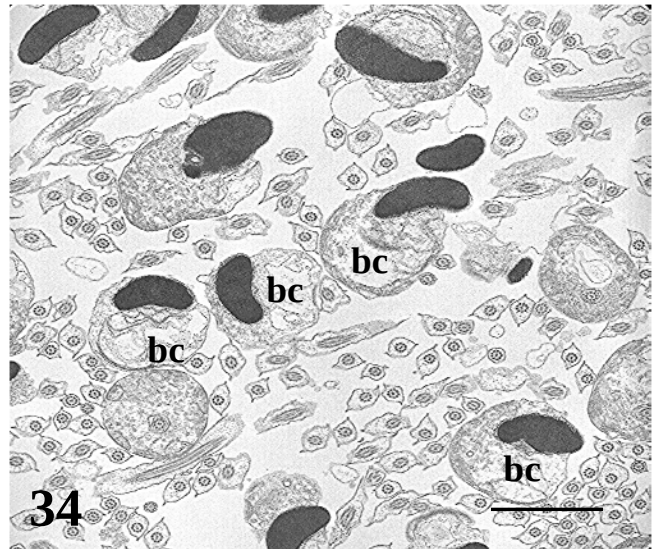
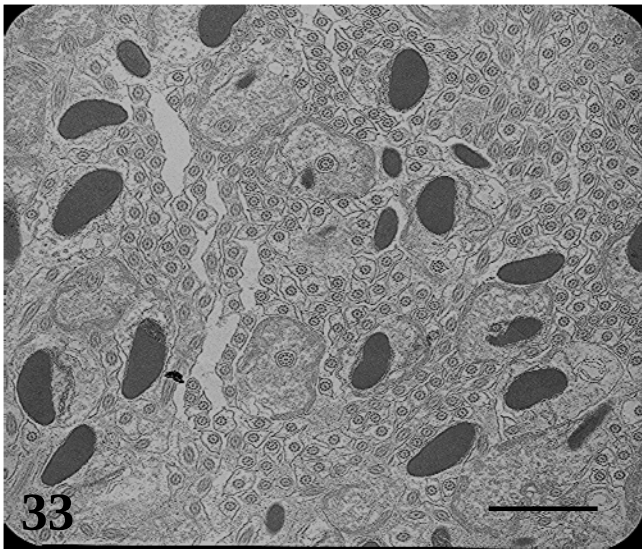
Fig. 35. Imatge al microscopi electrònic on s'observa la bossa citoplasmàtica que presenten els espermatozoides quan es troben al conducte espermàtic. bc: bossa citoplasmàtica. Barra= 5 µm.

Fig. 36. Micrografia de l'epiteli del conducte espermàtic amb nombroses projeccions i vesícules de secreció. ece: epiteli del conducte espermàtic; f: flagel; p: projeccions; sz: espermatozoide; v: vesícules. Barra= 1 µm.

Fig. 37. Acumulació d'espermatozoides cap al conducte espermàtic. Hematoxilina-Eosina. Barra= 200 µm.

Fig. 38. Al conducte espermàtic les cèl·lules sexuals masculines estan organitzades en petits grups o feixos. Mallory. Barra= 100 µm.

Làmina VII: Espermatozoides en conductes. Formació de la bossa citoplasmàtica

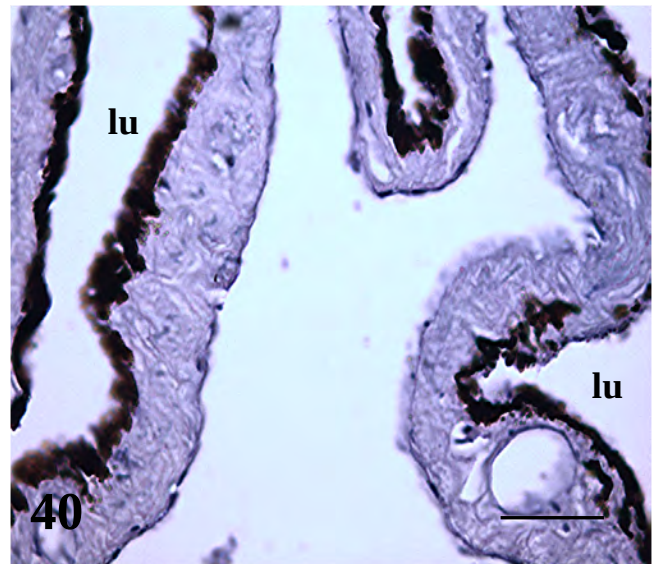
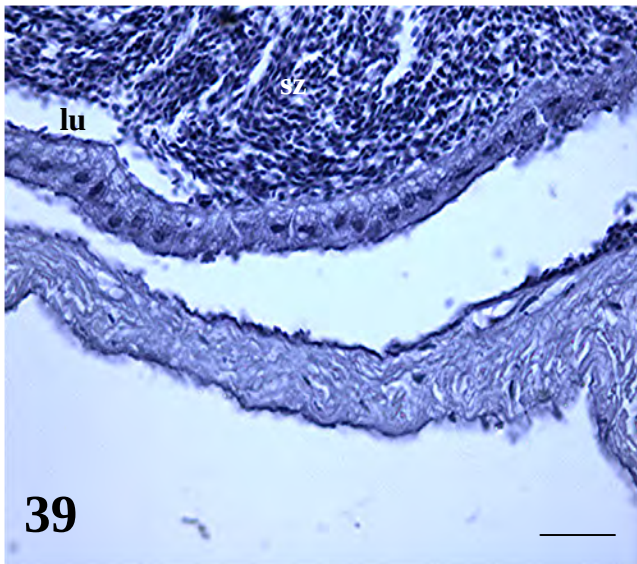


Làmina VIII: Espermatozoides en conductes. Formació de la bossa
citoplasmàtica

Fig. 39. Imatge on s'observa que les cèl·lules que delimiten el conducte espermàtic i els espermatozoides es tenyeixen amb la lectina *Triticum vulgaris* (WGA). lu: lumen del conducte espermàtic; sz: espermatozoides. Barra= 50 µm.

Fig. 40. Zona apical de les cèl·lules del conducte espermàtic que resultaren tenyides amb la lectina *Triticum vulgaris* (WGA). lu: lumen del conducte espermàtic. Barra= 50 µm.

Làmina VIII: Espermatozoides en conductes. Formació de la bossa citoplasmàtica



Làmina IX: Cicle anual morfologia testicular macroscòpica

Fig. 41. Testicles recol·lectats el mes de febrer, quan encara no han començat a augmentar de volum.

Fig. 42. Tall transversal d'un testicle en el mes de maig. Noti's el poc volum que presenten les gònades en aquest període.

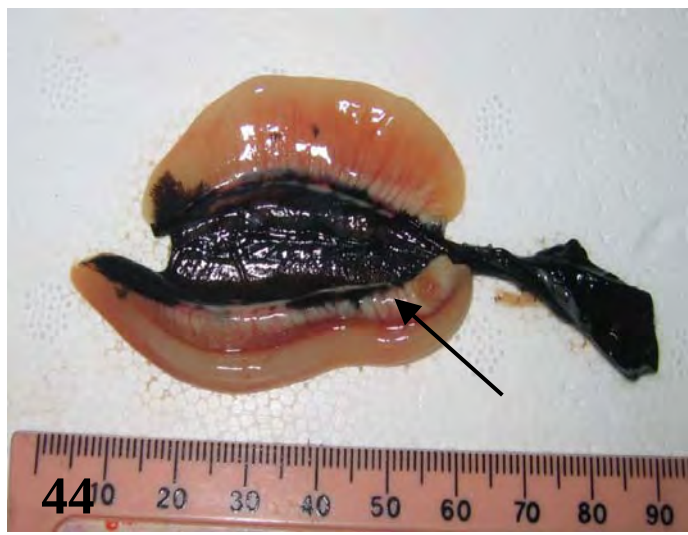
Fig. 43. Gònades masculines del mes de juny, on la proliferació cel·lular ja ha donat lloc a una petita quantitat d'esperma en la zona dorsolateral d'aquestes (→: esperma).

Fig. 44. En el mes de juliol, en els testicles ja s'observa com l'esperma comença a acumular-se als conductes espermàtics. (→: zona d'acumulació d'esperma).

Fig. 45. Testicles del mes de novembre, amb la zona que correspon als conductes espermàtics completament plena d'esperma.

Fig. 46. Comparació de les seccions transversals dels testicles de 4 mascles de mida relativament similar. Les seccions corresponen als mesos de març, abril, octubre i novembre respectivament.

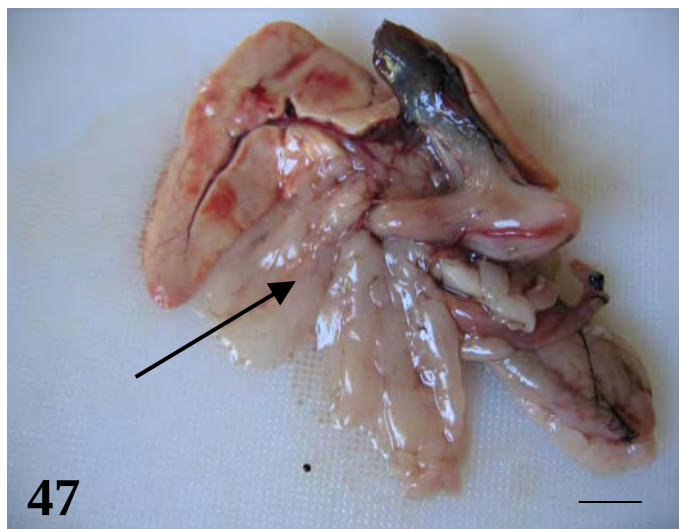
Làmina IX: Cicle anual morfologia testicular macroscòpica



Làmina X: Cicle anual morfologia testicular macroscòpica

Fig. 47. Vísceres d'un especímen recol·lectat en el mes de novembre, on veiem l'enorme quantitat de greix que presenten en aquesta època. →: greix. Barra: 2 cm.

Làmina X: Cicle anual morfologia testicular macroscòpica



Làmina XI: Cicle anual histològic dels testicles:

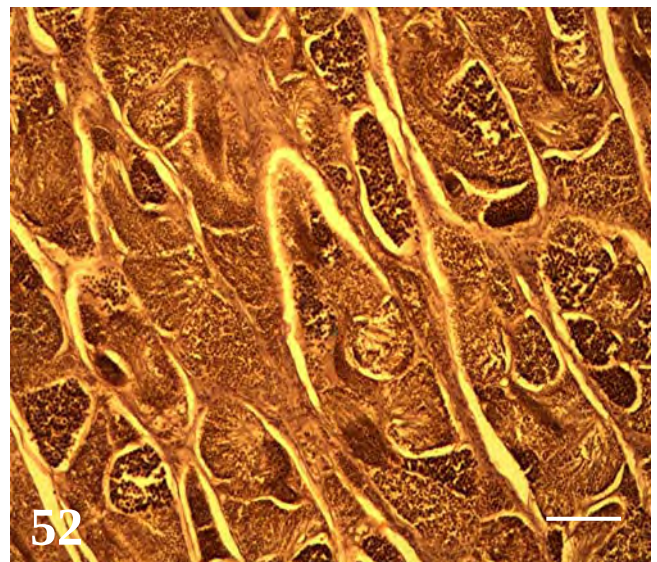
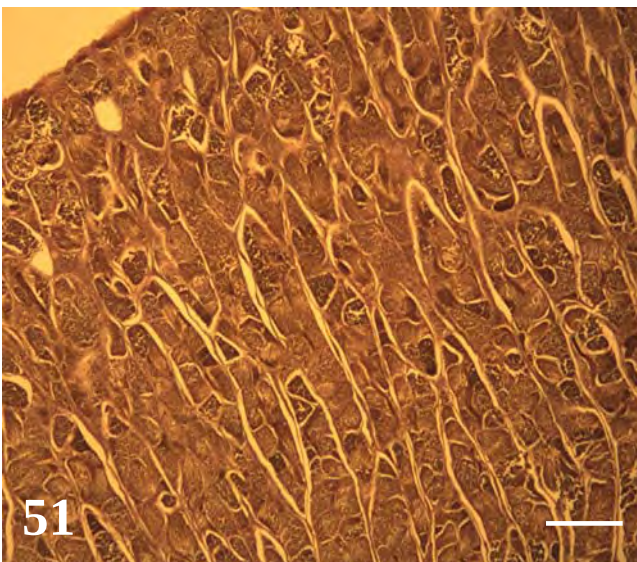
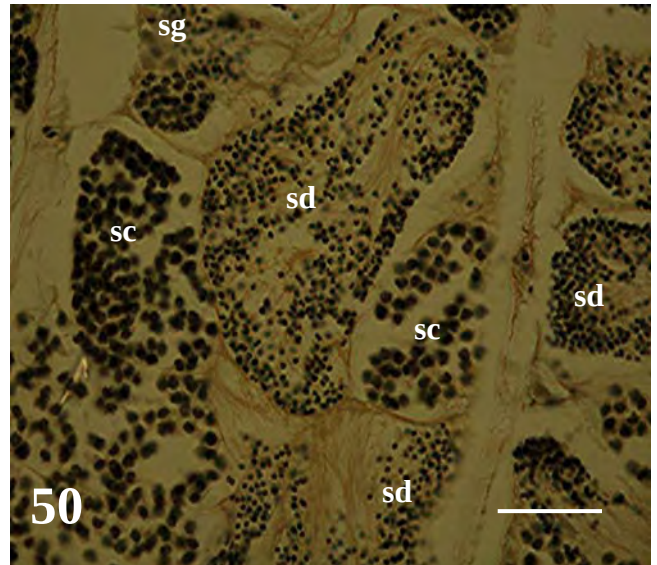
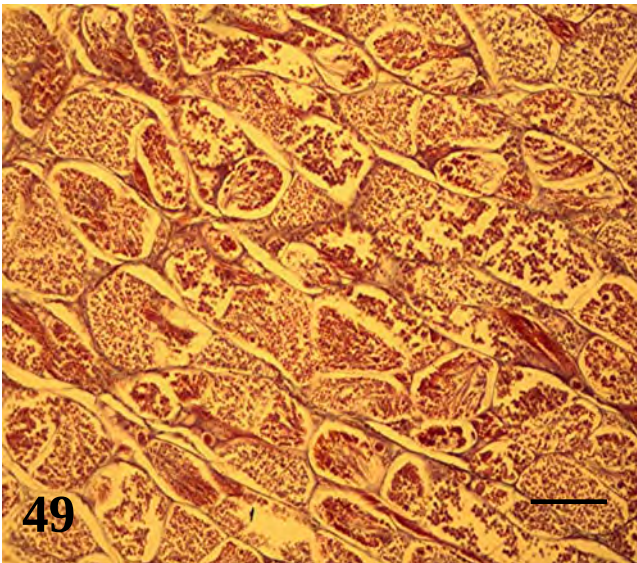
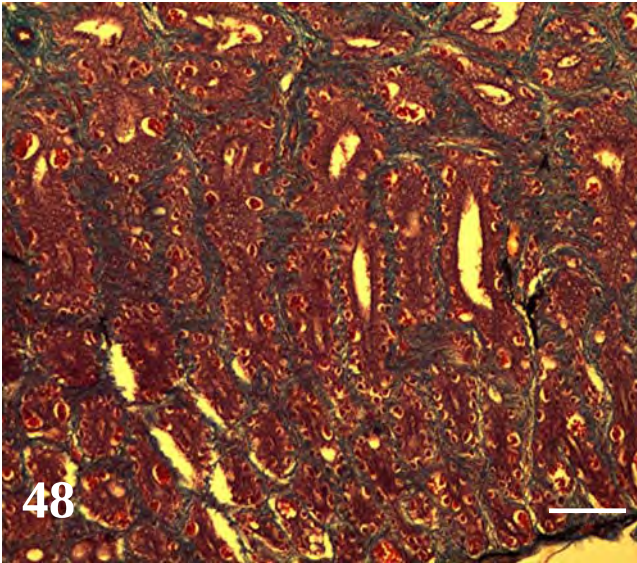
Fig. 48. Secció del mes d'abril en la que s'observen els lumens lobulars buits degut a l'alliberament d'esperma que s'ha donat en els mesos anteriors. Mallory. Barra= 100 µm.

Fig. 49. En el mes de juny, la proliferació de cèl·lules sexuals masculines dóna lloc a uns lòbuls testiculars amb tots els estadis de desenvolupament. Hematoxilina-Eosina. Barra= 100 µm.

Fig. 50. Imatge a més augment d'un tall transversal d'una gònada del mes de juny on podem trobar tots els estadis de desenvolupament que donaran lloc als espermatozoides. Hematoxilina-Eosina. Barra= 50 µm.

Figs. 51, 52. Testicles del mes de setembre on ja podem trobar tots els estadis de desenvolupament de les cèl·lules sexuals masculines. PAS-Schiff. Barra= 150 µm, 100 µm.

Làmina XI: Cicle anual histològic dels testicles:



Làmina XII: Cicle anual histològic dels testicles

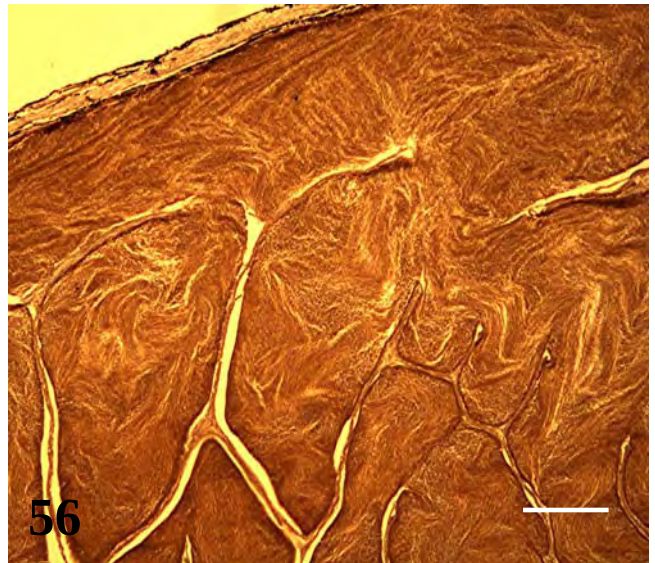
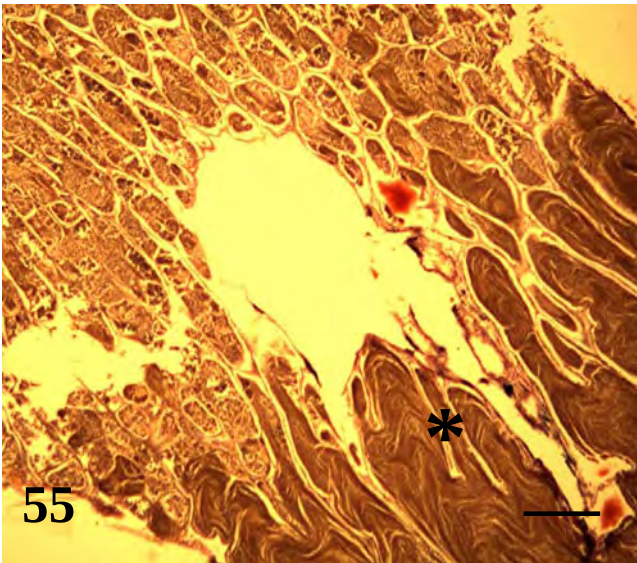
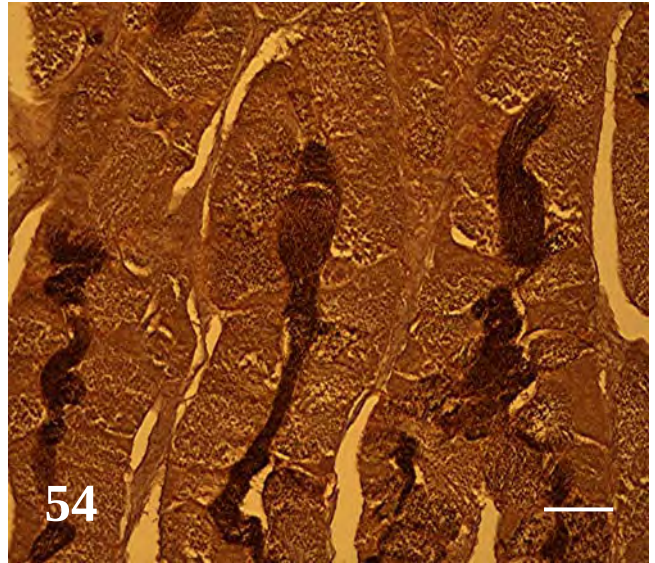
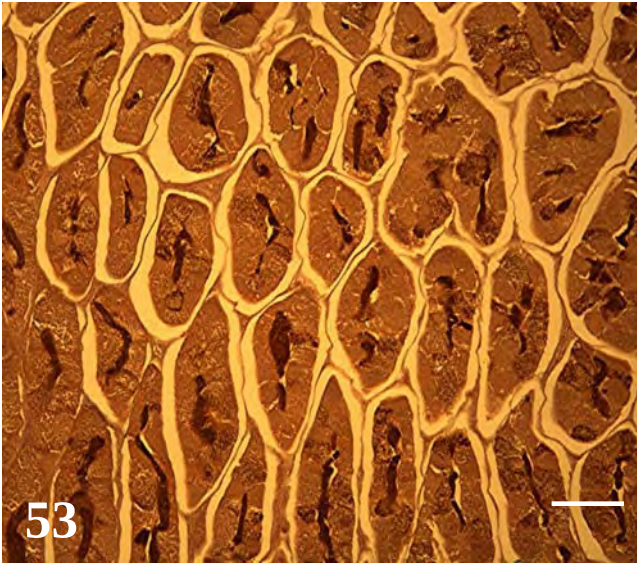
Fig. 53. Secció testicular del mes d'octubre on la proliferació cel·lular fa que el testicle tingui una aparença força homogènia, tret de petites àrees més fosques. PAS-Schiff. Barra= 200 μ m.

Fig. 54. Tall transversal de testicles del mes d'octubre on veiem que les zones més fosques corresponen a petites acumulacions d'espermatozoides. PAS-Schiff. Barra= 50 μ m.

Fig. 55. Acumulació dels espermatozoides produïts als conductes eferents. (*: conductes eferents). PAS-Schiff. Barra= 150 μ m.

Fig. 56. Concentració de cèl·lules sexuals masculines madures a punt per ser expulsades. PAS-Schiff. Barra= 100 μ m.

Làmina XII: Cicle anual histològic dels testicles



3.1.2 Discussió:

Segons l'estructura del compartiment germinal, els testicles dels teleostis poden classificar-se en tubulars o lobulars; i segons la distribució de les espermatogònies a dins els túbuls o lòbuls, en restringits o no-restringits (Grier, 1993). El testicle d'*Helicolenus dactylopterus dactylopterus* és del tipus lobular no-restringit, perquè està format per un conjunt de lòbuls que acaben amb un extrem cec a la perifèria del testicle i perquè les cèl·lules en estadi d'espermatogònia poden trobar-se al llarg de tota la longitud d'aquests lòbuls. Es tracta, en efecte, del tipus de testicle més comú dins els teleostis.

L'espermatogènesi en els peixos ha estat estudiada i resumida en diversos treballs (com ara Baccetti, 1970, 1991; Jamieson, 1991; Miura, 1999; Quagio-Grassiotto i Carvalho, 1999; Fishelson, 2003). L'anàlisi comparada del procés en diferents espècies mostra que, malgrat existir trets generals comuns, alguns aspectes com certs detalls morfològics de l'espermatozoide són específics de determinats taxons i, per tant, es poden utilitzar com a marcadors de l'evolució i de les relacions filogenètiques existents (Mattei, 1970, 1988; Jamieson, 1991, 2009). En aquesta discussió ens referirem bàsicament als trets masculins analitzats de l'espècie objecte d'estudi, però part dels resultats obtinguts es relacionaran posteriorment amb aspectes que fan referència tant a les femelles de la mateixa espècie com a d'altres espècies d'escorpènids per tal de situar la discussió general del treball en un context més filogenètic.

Les característiques observades en el penegal al llarg dels processos d'espermatocitogènesi i meiosi segueixen els patrons comuns a la majoria d'espècies íctiques. Així, per exemple, la làmina anellada o "lamella annulata" és usual en el citoplasma de les cèl·lules germinals dels peixos, normalment en cèl·lules germinals joves: bàsicament espermatogònies (Grier, 1975; Billard, 1984; Quagio-Grassiotto i Carvalho, 1999) com és el cas de l'espècie objecte d'estudi. Actualment encara no es coneix amb certesa la funció d'aquest orgànul, però sembla que està involucrat en el metabolisme de RNAs de llarga durada (Kessel, 1983; 1992).

Pel que fa al procés d'espermioquèsi, *H. dactylopterus* presenta trets més peculiars. D'acord amb Mattei (1970, 1988) el procés d'espermioquèsi en els Teleostis pot ser de dos tipus: I i II. Aquesta classificació es basa en l'existència de rotació nuclear durant el procés. Quan aquesta es dona, el flagel esdevé perpendicular al nucli i l'espermatozoide es defineix com a tipus I. Si no existeix rotació del nucli el flagel es manté paral·lel al nucli i, encara que aparegui algun tipus de fossa, els centríols es mantenen fora d'aquesta (llavors l'espermatozoide és del tipus II). Ara bé, la rotació nuclear pot ser incompleta i, en aquest cas, el flagel esdevé excèntric respecte el nucli i l'espermatozoide es considera intermedi entre el tipus I i el II. Treballs recents en les famílies Pimelodidae (Quagio-Grassiotto i Oliveira, 2007) i Heptapteridae (Quagio-Grassiotto *et al.*, 2005), mostren un desenvolupament flagel·lar medial respecte el nucli, sense existir rotació nuclear, fossa nuclear ni canal citoplasmàtic durant l'espermioquèsi. Aquestes característiques no s'havien trobat en altres espècies de peixos i els autors consideraren que era un nou tipus d'espermioquèsi, que anomenaren tipus III.

En l'espermioquèsi del penegal no existeix tampoc cap rotació nuclear, però en canvi el flagel s'insereix obliquament en el nucli i, gràcies al patró de condensació de la cromatina, acaben estant perfectament alineats. Per tant, l'espermatozoide d'*H. dactylopterus* no el podem incloure ni en el tipus I ni el tipus II i en canvi comparteix alguns trets amb el fins fa poc desconegut tipus III, malgrat tenir una petita fossa nuclear i un canal citoplasmàtic evident.

El desenvolupament de les espermàtides comença amb la formació de condensacions fibroses de cromatina en el nucli, condensacions que gradualment van augmentant de mida fins a donar lloc als grànuls electrodensos que caracteritzen aquest estadi. Aquests grànuls ocupen la major part del nucli, deixant una invaginació en una banda on els centríols establiran la peça mitja i donaran lloc a la base del flagel del futur espermatozoide. Aquesta invaginació és més o menys evident en funció de les espècies. En el cas del penegal, existeix una zona de menor condensació de la cromatina en un dels laterals del nucli, lloc on s'ubica el diplosoma. Durant l'estadi d'espermàtida, en aquesta zona del diplosoma observem una

substància amorfa que possiblement té la funció de reforçar i estabilitzar la unió entre el complex centriolar i el nucli; i que probablement acaba formant la massa lleugerament electrodensa que s'observa al costat oposat del cos basal de l'espermatozoide. Aquesta substància s'ha observat també en espermàtides d'espècies com *Poecilia latipinna* (Grier, 1973), *P. reticulata* (Billard, 1970) i *Gambusia affinis* (Grier, 1975), acompanyada de microtúbuls. Als microtúbuls associats a la fossa nuclear en l'estadi d'espermàtida se'ls hi atribueixen funcions de transport de polisacàrids i proteïnes (Tandler i Moriber, 1966), citoplasma (Fawcett *et al.*, 1971; Tokuyasu, 1975), ions (Clark, 1967) i excés de nucleoplasma (Tokuyasu, 1974), de manera que semblen ser importants en el procés d'eliminació de les restes del nucli un cop condensada la cromatina nuclear de l'espermàtida. Al mateix temps, donen suport als importants canvis en la forma del nucli que es donen en l'espermioogènesi, i ajuden a mantenir la relació entre el complex centriolar i el nucli (Grier, 1975).

A causa de la seva situació, les cèl·lules de Sertoli que delimiten les parets dels cists espermatogènics estan forçosament involucrades en el transport de material cap als gàmetes en desenvolupament, fet que és molt important per la supervivència de les cèl·lules germinals i la seva maduració (Grieswold i Russell, 1999). Així, per exemple, el gran nombre de ribosomes observats en el reticle de les cèl·lules de Sertoli evidencia que dins les cisternes existeix un actiu procés de producció de proteïnes. Aquests productes s'acumulen al reticle endoplasmàtic llis, donant-li una opacitat aparent. Des d'aquests centres de producció, via grans xarxes de nano-túbuls, les proteïnes són transportades a diferents llocs de l'espermatozoide en desenvolupament, on seran sobretot destinades a la maduració del seu cap i cua (Fishelson *et al.*, 1990).

Per altra banda, la conseqüència més important de les complexes interdigitacions, unions desmosòmiques i unions adherents observades entre les cèl·lules de Sertoli quan les cèl·lules germinals que engloben es troben en un estadi de desenvolupament avançat, és l'establiment de l'anomenada "blood-testis barrier", principal responsable de la protecció de les cèl·lules

germinals envers agents externs. S'han efectuat diversos estudis per tal de demostrar l'existència d'aquesta barrera en peixos teleostis utilitzant diferents traçadors, com els treballs realitzats en les espècies *Aphanius dispar* (Abraham *et al.*, 1980), *Oerochromis niloticus* (Lou i Takahashi, 1989), *Poecilia reticulata* (Marcaillou i Szöllösi, 1980; Bergmann *et al.*, 1984), *Ameca splendens* (Bergmann *et al.*, 1984), *Oryzias latipes* (Shibata i Hamaguchi, 1986) o l'experiment utilitzant el marcador Horseradish Peroxidase (HRP) realitzat per Nagahama (1983). L'autor va observar que en els testicles del l'espècie *Poecilia reticulata* les unions fortes entre les cèl·lules de Sertoli evitaven el transport de l'HRP des de l'àrea intersticial cap al lumen central dels túbuls seminífers. En el treball de Lou i Takahashi (1989), on també s'utilitzà com a traçador l'HRP, demostraren que l'establiment definitiu d'aquesta barrera no s'acomplia fins que les cèl·lules germinals del cist entraven en l'estadi d'espermàtides mitjanament o força avançades. A l'inici del procés, les cèl·lules de Sertoli envolten una espermatogònia mantenint aquest embolcall incomplet per la banda de la membrana basal. Posteriorment, amb l'avanç de l'espermatogènesi i només quan les cèl·lules germinals es troben en estadi d'espermàtides avançades, es formen les unions adherents que conformen la "blood-testis barrier" i que les aïlla del sistema circulatori. L'existència d'aquesta barrera ha estat demostrada no només en mamífers (Dym i Fawcett, 1970; Setchell i Waites, 1975; Dym i Cavicchia, 1979), sinó també en insectes (Szöllösi i Marcaillou, 1977), nemàtodes (Marcaillou i Szöllösi, 1980), i en peixos ciprinodonts (Abraham *et al.*, 1980; Marcaillou i Szöllösi, 1980). Es creu que aquesta organització evita que les cèl·lules immunològiques del mascle i components citotòxics entrin en contacte amb les espermatides i espermatozoides que es troben dins els cists. Al mateix temps, permet l'existència d'un microambient favorable i el suport citoestructural necessari pel bon desenvolupament de les cèl·lules espermatogèniques.

En el cas d'*H. dactylopterus*, s'han evidenciat clarament amb microscopia electrònica les unions adherents i desmosòmiques entre les cèl·lules de Sertoli, malgrat que l'anàlisi amb traçadors no ha permès concretar en quin moment de l'espermatogènesi s'estableix aquesta barrera.

Per altra banda, els vacúols heterofàgics detectats en el citoplasma d'algunes cèl·lules de Sertoli posen de manifest la seva activitat fagocítica.

Es creu que les cèl·lules precursors de les cèl·lules de Sertoli existeixen com a cèl·lules mesenquimàtiques en el teixit connectiu interlobular (Pudney, 1993). En la majoria de peixos proliferen especialment durant els primers estadis de l'espermatogènesi i degeneren després del procés d'espermiació. No obstant, en algunes espècies les cèl·lules de Sertoli poden persistir com una monocapa de cèl·lules secretores en la perifèria del lòbul un cop acabada l'espermiació, tal i com va constatar Billard l'any 1983 en l'espècie *Salmo gairdneri* o Sàbat (2005) en *Scorpaena scrofa* i *S. porcus*, on les cèl·lules de Sertoli s'hipertrofien i es converteixen en cèl·lules columnars que ressegueixen la llum del lòbul. Aquest fenomen també l'hem observat en *H. dactylopterus*. En aquest estadi, les cèl·lules de Sertoli columnars presenten nombrosos vacúols heterofàgics, signe de l'activitat fagocítica que desenvolupen sobre les cèl·lules germinals no funcionals que queden en els túbuls espermàtics (Grier, 1993, Fishelson, 2003; Soley i Van Vuren, 1984). La presència de granulòcits detectada a l'estroma interlobular en l'època de post-posta està lligada també a la citada eliminació de cèl·lules residuals: es tracta de cèl·lules immunològiques que s'encarreguen d'eliminar les restes que poden quedar després de l'expulsió dels espermatozoides madurs.

En referència a l'espermatozoide d'*Helicolenus dactylopterus*, aquest pot ser classificat com del Tipus I "anachrosomal introsperm" definit per Jamieson i Leung (1991). La detallada revisió de les característiques dels espermatozoides i els testicles relacionades amb la inseminació en els peixos ossis, feta per Burns i Weitzman (2005), mostra que la majoria d'aquestes espècies presenten allargament del cap i la peça mitja de l'espermatozoide, diversos tipus de paquets d'esperma o espermatozeugmata, i que els seus testicles solen presentar majors àrees d'emmagatzematge d'esperma.

En aquest sentit, l'allargament del nucli de l'espermatozoide es pot relacionar amb funcions molt diverses que tenen a veure tant amb el transport de l'esperma en espècies de fecundació interna com amb el seu emmagatzematge

(Jamieson, 1987). Un nucli més estilitzat pot ajudar al pas dels espermatozoides a través de les estretes àrees i els viscosos fluids del tracte reproductor femení (Gardiner, 1978), al mateix temps que també pot ajudar en la formació dels paquets d'esperma (Atwood i Chia, 1974). Per tant, l'allargament del nucli pot facilitar l'alineament lateral dels espermatozoides que es mouen a través dels conductes testiculars (Burns *et al.*, 1995), tal i com s'observa en *H. dactylopterus*, i també la formació de grups molt més compactes (Atwood i Chia, 1974; Burns i Weizman, 2004).

Per altra banda, l'allargament de la peça mitja observada en els espermatozoides del penegal permet incrementar la capacitat oxidativa i el suplement energètic de la cèl·lula, tal i com s'ha descrit per a d'altres espècies (Fawcett, 1970; Lahnsteiner i Patzner, 1998; Vladic *et al.* 2002). En aquest sentit, cal recalcar que un augment en el nombre i/o en la mida dels mitocondris pot ajudar a prolongar l'esperança de vida de l'espermatozoide durant el seu emmagatzematge intraovàric, així com proporcionar energia pel seu moviment dins la cavitat ovàrica (Pecio i Rafinsky, 1994; Yao *et al.*, 1995; Koya *et al.*, 2002); característiques essencials per l'acompliment dels objectius imprescindibles per a la reproducció: la inseminació i la consegüent fertilització.

Pel que fa a la membrana flagel·lar, aquesta presenta dues extensions laterals en forma d'aletes, tret també descrit en altres grups com els Perciformes, on a vegades la membrana flagel·lar forma una, dues o tres extensions laterals (Jamieson, 1991; Mattei, 1988; 1991). La funció d'aquestes extensions no està clarament definida, però probablement ajuden a la natació dels espermatozoides.

Un tret molt destacable és la fracció de citoplasma detectada a una banda dels caps i peces mitges dels espermatozoides d'*H. dactylopterus* a partir del moment en què aquests ja es troben dins del conducte espermàtic.

Una primera possible explicació podria ser el fet que en l'esperma alliberat les cèl·lules germinals no fossin espermatozoides totalment madurs sinó espermàtides en la fase final de maduració; és a dir, en un estadi molt proper al final de l'espermioogènesi. Aquesta hipòtesi seria raonable si els espermatozoides quedessin retinguts dins els testicles, fet que seria interpretat

com un cas espermatogènesi semicística, en la que es dona un trencament prematur dels cists que delimiten les cèl·lules de Sertoli. Aquest tipus d'espermatogènesi, malgrat ser considerada inusual, ha estat descrita en varies espècies relacionades amb el penegal, com diferents escorpènids del gènere *Scorpaena* (Muñoz *et al.*, 2002c; Sàbat, 2002). L'espermatogènesi semicística comporta l'existència simultània en el fluid seminal dels dos tipus de cèl·lules germinals: espermàtides i espermatozoides, les primeres de les quals completen el seu desenvolupament com a cèl·lules lliures dins el fluid dels conductes reproductors masculins. No obstant, en el cas del penegal, la total condensació de la cromatina nuclear d'aquestes cèl·lules germinals i l'existència d'un únic tipus cel·lular en els conductes eferents i espermàtic, suggereixen que es tracta d'espermatozoides madurs que esperen a ser inseminats cap a dins el cos de la femella, descartant-se, així, la hipòtesi de l'espermatogènesi semicística.

Una altra possibilitat seria que els espermatozoides observats en d'*H. dactylopterus* fossin paraespermatozoides, similars als descrits recentment en el còtid *Blepsias cirrhosus*, també escorpeniforme (Hayakawa i Munehara, 2004). Els paraespermatozoides són espermàtides aberrants amb un nucli bilobulat i la cromatina condensada en forma de grans glòbuls electrodensos. Presenten una gran quantitat de citoplasma, dos flagels i es troben al mateix cist junt amb els euespermatozoides normals. La primera raó que ens fa descartar aquesta possibilitat és que existeixen bosses citoplasmàtiques en pràcticament tots els espermatozoides observats, de manera que, en cas de ser vàlida aquesta hipòtesi, en l'espècie en estudi quasi no existiria cap euespermatozoide. Per altra banda, els paraespermatozoides descrits en el treball citat anteriorment i en invertebrats del grup Lepidoptera, Heteroptera i Gastropoda (Sivinski, 1984; Jamieson, 1987) són específicament caracteritzats per un nucli que es desenvolupa de manera anormal, i aquest no és el nostre cas.

Al comparar la morfologia espermàtica de dins els lòbuls testiculars i la dels espermatozoides de dins del conducte espermàtic, s'evidencia que aquesta massa citoplasmàtica es desenvolupa a la zona final del testicle, quan els

espermatozoides es troben al conducte espermàtic, abans de ser alliberats. Observacions de mostres de testicles al microscopi electrònic ens van mostrar que els espermatozoides madurs que encara estaven dins els lòbuls no mostraven la citada bossa, mentre que sí la presenten els que es troben dins del conducte espermàtic testicular o bé ja dins les criptes ovàriques, de manera que probablement aquesta massa es desenvolupi durant el pas dels espermatozoides a través del conducte espermàtic. Així, aquests són inseminats dins la femella amb aquestes masses citoplasmàtiques entorn els seus caps, i és en aquest estat que són emmagatzemats. El material que conté la bossa podria representar una font energètica de reserva per les cèl·lules sexuals masculines. Aquesta hipòtesi és veu recolzada per dos factors.

Per una banda s'han observat nombroses vesícules i projeccions de l'epiteli del conducte espermàtic dirigides cap a l'àrea on s'acumulen els espermatozoides madurs. Per tant, al lumen seria on els espermatozoides absorbirien alguns nutrients i els emmagatzemarien per tal de poder suportar el llarg període d'emmagatzematge intraovàric que els espera.

L'altre factor que reforça la citada hipòtesi és la tinció amb la lectina *Triticum vulgaris* (WGA), que marcà fortament les cèl·lules epitelials del conducte espermàtic, així com les bosses dels espermatozoides presents en aquesta zona del testicle, mentre que a la resta de la gònada no es tenyí cap cèl·lula sexual masculina. Les lectines ens mostren l'existència de glicoconjugats i, concretament, la lectina que s'utilitza s'uneix de manera reversible a la β -D-N-acetil-glucosamina. En l'estudi realitzat per Walter *et al.* (2005) a l'espècie *Leuciscus cephalus*, aquesta lectina marcà les estructures granulars o vesícules secretores de les cèl·lules epitelials dels conductes espermàtics, fet que porta als autors a proposar que representen una font de carbohidrats pel fluid espermàtic. També en l'estudi de Domeneghini *et al.* (2005) realitzat en l'espècie *Anguilla anguilla*, la lectina WGA, va servir per detectar productes de secreció de la superfície de l'epiteli estomacal.

Així doncs, en el cas d'*Helicolenus dactylopterus* els resultats suggereixen que és en el conducte espermàtic on els espermatozoides adquireixen i guarden algunes reserves per tal de resistir el llarg període d'emmagatzematge que patiran posteriorment dins de l'ovari.

A primer cop d'ull l'existència d'aquestes bosses citoplasmàtiques sembla sorprenent, ja que confereix una aparença molt poc hidrodinàmica. Cal tenir en compte, però, que els espermatozoides entren a l'ovari de forma agrupada, raó per la qual l'hidrodinamisme individual no és especialment important.

En algunes espècies l'esperma és alliberat del cos del mascle en estructures especialitzades anomenades paquets d'esperma: els espermatozeugmata i els espermatòfors. En el primer cas el paquet d'esperma està format per un conjunt d'espermatozoides units a una massa central gelatinosa, com per exemple es dona en els gèneres *Tyttocharax* i *Scopaeocharax* (Pecio *et al.*, 2005). En els espermatòfors, els espermatozoides estan empaquetats dins de cobertures sòlides o semi-sòlides que els protegeixen de la mateixa manera que ho fan els embolcalls de l'ou. Així, en aquest cas, la massa gelatinosa envolta el paquet d'espermatozoides externament (Burns *et al.*, 1995).

Tanmateix, en el cas d'*Helicolenus* no podem parlar de paquets d'espermatozoides perfectament definits i, per tant, no es poden considerar ni espermatòfors ni espermatozeugmata. Les cèl·lules sexuals masculines surten del testicle agrupades però no existeix cap massa gelatinosa central que els uneixi ni tampoc cap mena de cobertura externa. No obstant, és molt probable que sigui alguna substància secretada per les parets del conducte espermàtic la que mantingui els espermatozoides d'un grup més o menys compactats durant el trànsit cap al cos de la femella. Al associar-se els uns amb els altres asseguren l'eficiència de la seva transferència cap a dins el tracte reproductor femení: actuen com una unitat i aconsegueixen reduir la pèrdua de gàmetes masculins durant la còpula (Ginzburg, 1968).

Pel que fa al cicle anual de l'espècie, tant els canvis macroscòpics i histològics com les variacions en pes i mida dels testicles al llarg del cicle reproductiu, reflecteixen en quina etapa de desenvolupament es troba l'exemplar.

En els primers mesos de l'any, quan s'han expulsat els espermatozoides madurs i comença un nou cicle espermatogènic, els testicles presenten una mida més reduïda i una secció més aplanada degut al seu buidatge, raó per la qual l'índex gonadosomàtic (IGS) d'aquest període és baix. De fet, les

variacions d'aquest índex segueixen la tendència descrita en el treball de Muñoz i Casadevall (2002). Comença a augmentar de forma continuada en el mes de juny, mes que correspon a la fase de mitja recrudescència, en la que els cists contenen cèl·lules sexuals masculines en tots els estadis de desenvolupament, fet que explica aquest augment de pes de les gònades. L'increment més marcat en l'IGS que es detecta a continuació, durant els mesos de juliol i agost, denota la ràpida proliferació cel·lular que implica l'espermatogènesi, raó per la qual la condició (K) dels individus disminueix lleugerament al mateix temps que els testicles augmenten de volum i la seva secció esdevé més arrodonida i homogènia.

A partir del mes de juliol, l'índex hepatosomàtic (IHS) pateix un progressiu augment coincidint amb un destacat increment de l'acumulació de greix entorn les vísceres. L'espermatogènesi continua, i en el darrer trimestre de l'any els testicles mostren un major volum i un aspecte més blanquinós, degut a l'ompliment dels conductes seminífers amb esperma. Dins d'aquest mateix període s'evidencia una petita davallada tant en la condició com en l'IHS dels individus, probablement relacionat amb la fase final de maduració dels espermatozoides.

Cal tenir en compte que els dipòsits de lípids en els animals marins juguen un paper important com a reserves energètiques (Sargent *et al.*, 1989), però també en la regulació de la flotabilitat, i que el múscul i el fetge són els teixits on resideixen les majors reserves de lípids en la majoria de peixos (Love, 1980). El penegal viu en un ambient demersal amb condicions físiques relativament estables, gràcies a l'aïllament de les possibles turbulències de la superfície de l'aigua, però en determinades ocasions realitzen ascensos verticals, sovint relacionats amb l'obtenció d'aliment.

En l'estudi de Mendez *et al.* (1993) determinaren que els dipòsits de lípids als ossos i músculs funcionaven com un magatzem d'energia i un agent hidrostàtic en el penegal, espècie que manca de bufeta natatòria. Així doncs, la presència de lípids en els seus teixits permet al penegal realitzar migracions verticals en busca d'aliment. Anàlisis del contingut estomacal del penegal revelen que s'alimenta de preses tant batipelàgiques com mesopelàgiques (Schwed, 1983), evidència clara d'aquestes migracions verticals. Els autors consideren que

aquests àcids grassos es sintetitzen al fetge i que després són transportats al teixit adipós dels ossos on s'emmagatzemen, hipòtesi que explicaria l'evolució relativament poc clara del pes del fetge al llarg de l'any.

A finals d'octubre i principis del mes de novembre, període durant el qual es dona la maduració final del testicle, s'observa un notable decreixement de l'IGS. Així, malgrat que el testicle entra en la fase final de maduració, el pes relatiu del testicle disminueix. Aquest fet s'explica perquè en aquest estadi ja no hi ha espermatogènesi sinó només espermiogènesi, procés durant el qual bona part del citoplasma cel·lular és fagocitat per les cèl·lules de Sertoli i eliminat, de manera que el pes final de la gònada és menor (Stoumboudi *et al.*, 1993).

Els valors encara baixos del mes de desembre i principis d'any, evidencien l'expulsió d'espermatozoides en les còpules. Un cop superat el període de post-posta, el pes dels testicles comença de nou a augmentar degut a l'inici d'un nou cicle d'espermatogènesi.

3.2 FEMELLES: ESTRUCTURA OVÀRICA, EMMAGATZEMATGE D'ESPERMATOZOIDES I CICLE ANUAL.

3.2.1 Resultats:

En aquest apartat ens proposem analitzar des de diferents punts de vista tot el procés d'emmagatzematge intraovàric d'espermatozoides, a diversos nivells i utilitzant diferents tècniques.

Malgrat que ja hem publicat part d'aquest treball (Vila *et al.*, 2007a i 2007b), posteriorment hem complementat aquests resultats parcials de manera que a continuació exposem i discutim el tema globalment.

✓ 3.2.1.1 Estructura ovàrica:

Els ovaris de l'espècie en estudi són dos òrgans allargats (Fig. 57), paral·lels entre sí i situats a la regió dorsal de la cavitat abdominal. Estan adherits a la paret d'aquesta última per una capa de teixit mesentèric de color negre, anomenada mesovarium.

De cadascuna de les gònades en surt un conducte anomenat oviducte (veure la mateixa figura) que discorre entre la bufeta urinària i l'intestí. Aquest oviducte s'acaba fusionant amb el conducte urinari, desembocant a l'exterior a través d'una obertura o gonoporus de la papil·la urogenital.

Els ovaris són del tipus cistovàric descrit per Hoar (1969). Tenen forma de sac i una secció transversal més o menys circular. Presenten un raquis musculocnectiu que discorre longitudinalment en una posició més o menys central. Quan les femelles estan en època de post-posta s'evidencia macroscòpicament aquest raquis, d'un to més fosc travessant longitudinalment l'ovari (Fig. 58). D'aquest raquis en surten radialment les lamel·les ovàriques, que incrementen la superfície germinal de la gònada (Fig. 59). Cada lamel·la està suspesa en l'espai intraovàric per un tronc fibromuscular molt irrigat (Fig. 60), al llarg del qual se situen els oòcits en estat de maduració creixent a mesura que ens allunyem del raquis central (Muñoz *et al.*, 1999) (Fig. 61). Per tant, a la base de les lamel·les hi ha els oòcits en estat més primerenc de maduració, com són les

oogònies o els oòcits en estadi de cromatina-nucleolar, i quan més lluny del raquis central més madurs són aquests. Els oòcits estan sostinguts per uns peduncles (Fig. 62) mitjançant els quals s'uneixen a les lamel·les (Fig. 63), a la base de les quals hi solem trobar vasos sanguinis. Aquestes lamel·les estan delimitades per un epiteli monoestratificat (Fig. 64). Quan els oòcits esdevenen plenament madurs són alliberats al lumen ovàric per tal de ser fertilitzats en el moment adequat.

La paret ovàrica està formada per tres capes (Fig. 65). La més externa està integrada per un conjunt de cèl·lules aplanades. La capa mitjana, muscular, consta de tres subcapes: una externa de musculatura longitudinal, una de musculatura circular i una altra de longitudinal interna. Aquestes capes musculars presenten molts vasos sanguinis. La capa més interna de la paret està delimitada per un epiteli monoestratificat cúbic.

✓ 3.2.1.2 Criptes d'emmagatzematge d'espermatozoides :

Les estructures d'emmagatzematge d'espermatozoides estan localitzades prop del raquis muscular-connectiu que travessa la gònada centralment i longitudinalment, concretament a la base de les lamel·les ovàriques (Figs. 66 i 67), i sovint es troben a prop de vasos sanguinis (Figs. 68 i 69). Les criptes d'emmagatzematge presenten una morfologia general arrodonida o el·líptica, si bé poden presentar formes molt irregulars que probablement es deuen a la fusió entre elles (Fig. 70).

Estan delimitades per un epiteli criptal que envolta i tanca els espermatozoides. Aquest està format per un epiteli cúbic simple que descansa sobre una làmina basal, i que està envoltat per una capa de fibres musculars llises (Fig. 71). La morfologia cel·lular és molt similar a la de l'epiteli lamel·lar. Els nuclis de les cèl·lules epitelials tenen una forma esfèrica o ovalada amb indentacions més o menys evidents segons l'estadi reproductiu en el que es troba l'animal.

Les cèl·lules epitelials que envolten les criptes estan fermament unides entre elles per unions fortes i una enorme quantitat de desmosomes, indicant l'existència d'una compartimentació de la cavitat ovàrica (Figs. 72, 73).

✓ 3.2.1.3 Cicle anual:

▪ Canvis macroscòpics dels ovaris:

Els ovaris d'*H. d. dactylopterus* tenen una morfologia fusiforme i una secció el·líptica o arrodonida en funció del moment del cicle reproductiu en el que es troben. En el període en què els ovaris comencen el cicle de desenvolupament oocitari, entre els mesos d'abril a juny, aquests presenten una secció transversal perfectament rodona (Fig. 74). És en aquest moment quan les parets ovàriques són gruixudes i dures; la gònada mostra un color rosa clar semi-transparent (Fig. 75).

A partir del mes de novembre els ovaris comencen a créixer tot mantenint la forma fusiforme. La paret ovàrica esdevé més prima degut a l'augment de volum que experimenten els òvuls madurs que comencen a omplir la cavitat ovàrica. El color dels ovaris en aquesta època va del rosat a un to groguenc.

Al llarg dels mesos de novembre, desembre i gener, els ovaris esdevenen cada cop més voluminosos. La paret ovàrica es torna molt prima i força transparent, deixant veure els evidents òvuls de color groc pàl·lid que hi ha a sota (Fig. 76). Quan les gònades estan plenes d'oòcits madurs, principalment des del mes de desembre fins al mes de març, l'augment de volum és molt marcat (Fig. 77) i la secció transversal de l'ovari esdevé el·líptica (Fig. 78). En els mesos de gener i febrer podem trobar tant femelles amb embrions al seu interior, com femelles que ja han alliberat la posta al medi marí. A mesura que avança el desenvolupament, els ovaris continuen augmentant de mida. Els ovaris d'exemplars capturats el mes de març són translúcids degut a la clarificació del vitel (Fig. 79). Quan els ovaris contenen embrions són molt més fràgils (parcialment degut a que la paret ovàrica s'ha fet més prima), contenen molt fluid i són tous.

A l'abril totes les femelles han alliberat la posta i es ovaris tornen a ser reduïts i de color rosat (Fig. 80). A la Figura 81 podem observar l'evolució anual en la morfologia de la secció transversal ovàrica de l'espècie en estudi.

Cal fer esment que les reserves de greix visceral són especialment abundants en els mesos centrals de l'any. Aquest greix té un color blanquinós, grisenc, i només pot ser comptabilitzat en els mesos on és especialment abundant, mesos en els quals recobreix bona part de les vísceres (Figs. 82, 83 i 84).

- Índexs relacionats amb la reproducció:

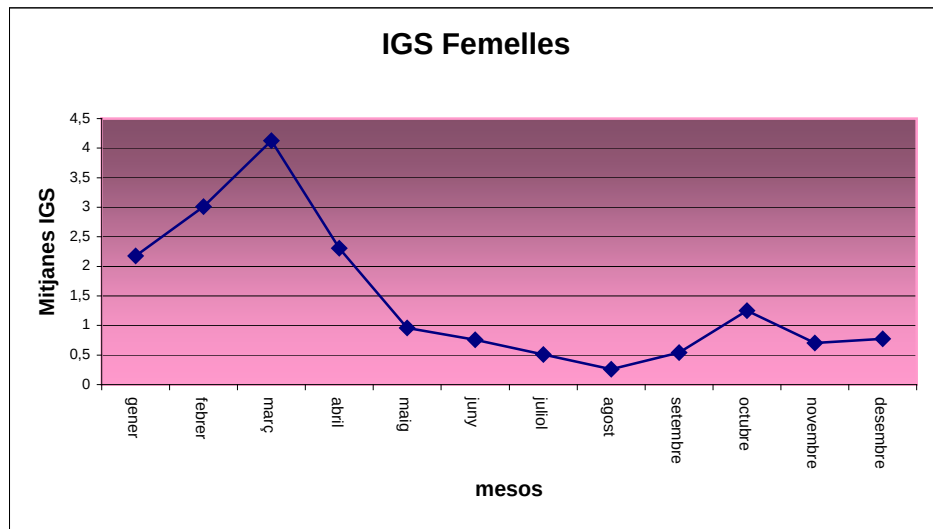
A més d'observar els canvis que experimenten els ovaris al llarg de l'any, també es van calcular els diversos índexs relacionats amb la reproducció que s'han detallat en el capítol sobre els mascles: l'índex gonadosomàtic (IGS), l'índex hepatosomàtic (IHS) i el factor de condició relativa (Kn).

En els gràfics i les taules següents es mostren les mitjanes obtingudes pels índexs, per tal de comprovar si l'evolució anual d'aquests índexs en els nostres espècimens coincideix amb l'obtinguda en els treballs previs duts a terme pel nostre grup de recerca.

Taula 1: Dades mensuals del IGS dels espècimens mostrejats:

	N	IGS	MEDIANA	SD
gener	51	2,179	2,636	1,443
febrer	77	3,008	3,818	2,210
març	15	4,125	4,115	3,053
abril	18	2,306	2,574	1,553
maig	15	0,959	0,779	3,173
juny	4	0,760	0,904	0,247
juliol	2	0,508	0,508	0,023
agost	6	0,261	0,287	0,234
setembre	9	0,541	0,540	0,083
octubre	9	1,252	0,996	0,253
novembre	6	0,703	0,602	0,484
desembre	21	0,772	1,182	0,554
Totals	233			

Gràfic 1: Evolució anual de l'índex gonadosomàtic

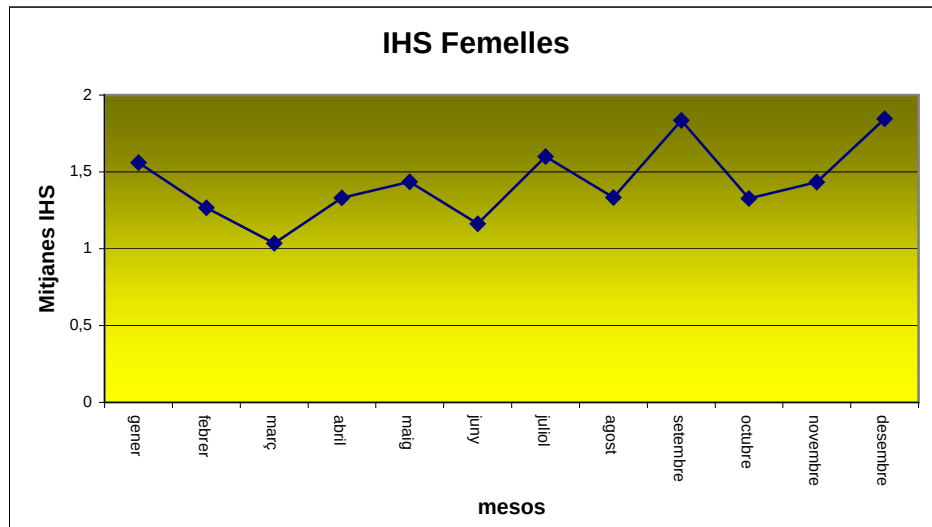


En el cas de l'IGS, es detecta un increment molt important en els primers mesos de l'any, fins arribar a un valor màxim en el mes de març. En els mesos següents els valors de l'índex gonadal disminueixen marcadament fins a mantenir-se en valors relativament estables fins als mesos finals de l'any, quan tornen a augmentar de forma progressiva. Evidentment, en el cas de les femelles aquest índex assoleix valors molt més elevats que en els mascles degut a l'important augment del volum ovàric que experimenten a mesura que ens apropem a l'època de posta.

Taula 2: Dades mensuals de l'IHS dels espècimens mostrejats:

	N	IHS	MEDIANA	SD
gener	51	1,561	1,766	0,744
febrer	76	1,267	1,315	0,657
març	17	1,035	0,845	0,993
abril	19	1,331	1,385	0,823
maig	15	1,435	1,433	0,765
juny	4	1,162	1,155	0,253
juliol	2	1,599	1,618	0,346
agost	6	1,333	1,397	0,513
setembre	9	1,835	2,021	0,584
octubre	9	1,328	2,507	1,132
novembre	6	1,434	0,857	0,476
desembre	21	1,846	1,825	0,759
Totals	235			

Gràfic 2: Evolució anual de l'índex hepatosomàtic:

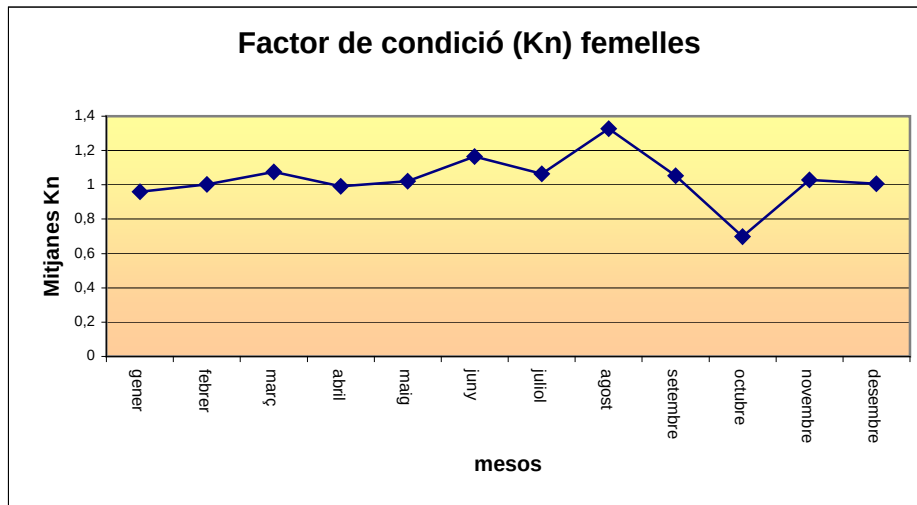


En l'evolució anual d'aquest índex veiem que els valors es mantenen més o menys constants al llarg de l'any. Només destaquem 2 pics evidents: el pic amb valors més baixos que coincideix amb el final de l'època de posta i dos pics elevats a mitjans de tardor i inici d'hivern, moment en el que les dimensions del fetge poden ser realment molt importants (veure Fig. 77).

Taula 3: Dades mensuals del valor Kn dels espècimens mostrejats:

	N	Kn	MEDIANA	SD
gener	51	0,959	0,961	0,116
febrer	77	1,002	0,979	1,144
març	17	1,076	1,040	0,185
abril	19	0,991	0,987	0,099
maig	15	1,021	0,985	0,178
juny	4	1,164	1,098	0,346
juliol	2	1,064	1,066	0,103
agost	6	1,327	1,290	0,234
setembre	9	1,052	1,072	0,055
octubre	9	0,697	0,703	0,237
novembre	6	1,029	1,035	0,074
desembre	21	1,007	1,000	0,078
Totals	236			

Gràfic 3: Evolució anual del factor de condició:



Pel que fa al factor de condició (Kn), índex que reflexa l'estat físic dels exemplars, en el cas de les femelles s'observa que oscil·la lleugerament al llarg de l'any, tret dels mesos de setembre i sobretot d'octubre, mes en el que la condició de les femelles sembla estar una mica perjudicada.

Pel que fa a les reserves de greix, factor que podria ser un bon indicador de l'estat de l'animal, aquestes són especialment abundants en els mateixos mesos centrals de l'any en què el factor Kn augmenta lleugerament (Fig. 82, 83 i 84).

✓ Canvis histològics dels ovaris:

El creixement dels oòcits pot dividir-se en diverses fases: una fase de creixement primari, una fase de creixement secundari i una fase de maduració.

En la fase de creixement primari, que en el penegal es dona des del març fins al novembre, podem trobar oogònies (Fig. 85) i oòcits en els estadis cromatina-nucleolar (Fig. 86) i perinucleolar (Fig. 87), però no oòcits vitel·logènics.

En l'estadi d'alvèols corticals, en el mes de novembre, ja estem dins la fase de creixement secundari i apareixen ja els primers oòcits en fase de formació dels

al·vèols corticals (Fig. 88), existint també tots els altres estadis anteriors. Al desembre els oòcits entren en el procés de vitel·logènesi, evidenciat pel fet que podem observar l'aparició de grànuls de vitel i el creixement progressiu d'aquests (Figs. 89 i 90). La mida i nombre d'aquests grànuls de vitel anirà augmentant donant lloc als diferents estadis vitel·logènics (I, II, i III).

Entrat el mes de gener i durant el febrer els oòcits estan en fase de maduració, és a dir, s'evidencien oòcits madurs amb el nucli en migració cap a un dels pols de la cèl·lula i amb el citoplasma ple de grànuls de vitel i grans gotes lipídiques (Fig. 91). Al final d'aquesta fase es fusionen els grànuls de vitel entre sí, tot formant una massa homogènia, i els oòcits s'hidraten (Fig. 92). El fol·licle no s'allibera junt amb l'oòcit a l'ovulació, sinó que es manté formant l'anomenat fol·licle postovulatori. La presència simultània d'alguns fol·licles postovulatoris demostra que la posta es dona a partir d'aquest moment.

Ja a finals del mes de març els ovaris entren en la post-posta, que coincideix amb la dels mascles. Podem observar molts nius d'oogònies a la base de les lamel·les i alguns oòcits en els primers estadis de desenvolupament.

✓ Canvis histològics de les criptes:

L'antígen nuclear de proliferació cel·lular (PCNA) permet detectar les cèl·lules que estan en una fase activa del cicle cel·lular. Les cèl·lules que van resultar més fortament marcades per l'antígen nuclear foren les oogònies primàries (Fig. 93), el nucli de les quals va adquirir un to marronós.

Vàries fotografies realitzades al microscopi òptic ens insinuen quin és el procediment de formació de les criptes a mesura que els espermatozoides entren en contacte amb l'epiteli lamel·lar. Sembla que les cèl·lules sexuals masculines es dirigeixen en grup cap a la zona interlamel·lar (Fig. 94), on s'acumulen, per després acabar essent englobades per les cèl·lules epitelials d'aquesta zona formant una cripta (Figs. 95, 96).

Cal destacar que amb l'antígen de proliferació cel·lular (PCNA), també resultaren tenyides algunes de les cèl·lules que envolten les criptes, precisament les que es troben en contacte amb la cavitat ovàrica. La tinció es

realitzà en mostres de diferents mesos de l'any, i s'observà que la proliferació de les cèl·lules del voltant de les criptes és marcadament superior en els mesos d'estiu, quan s'inicia el període d'emmagatzematge i de formació de criptes (Figura 97).

El nombre i les característiques de les criptes varien en funció de la fase del cicle reproductiu en la que es troben. Així, quan s'inicia un nou cicle reproductiu el nombre de criptes és escàs. Al principi del període d'emmagatzematge - mesos de juny i juliol -, quan el nombre de cèl·lules sexuals masculines a l'interior de les criptes és baix, els espermatozoides estan distribuïts a l'atzar, sense cap ordre concret (Fig. 98). Després, a mesura que avança el període d'emmagatzematge, les criptes semblen ser cada vegada més abundants (Fig. 99) i contenen quantitats d'espermatozoides cada vegada més importants (Fig. 100). Progressivament la presència de vasos sanguinis entorn les criptes també s'evidencia cada cop més (Fig. 101). Per tant, es constata que la vascularització incrementa notablement amb l'aproximació de l'època de posta - i per tant, el final del període d'emmagatzematge -, concentrada entre els mesos de febrer i març. És precisament en aquestes dates quan es comencen a detectar criptes que al microscopi òptic semblaven buides (Fig. 102), però que mitjançant posteriors observacions al microscopi electrònic s'evidencià que contien material amorf i alguna resta d'espermatozoides. Existeix un decreixement gradual en el nombre d'espermatozoides existents dins de les criptes a mesura que l'època de posta avança (Fig. 103).

Amb l'avanç del període d'emmagatzematge i l'aproximació a l'època de posta, les cèl·lules sexuals masculines s'organitzen mínimament de costat i apareixen més densament empaquetades en les criptes pel fet que el nombre d'espermatozoides és major. Així, quan el nombre d'espermatozoides empaquetats en una mateixa cripta és més important, semblaria que es veuen obligats a compactar-se i alinear-se mínimament (Figs. 104, 105). D'aquesta manera, en cada una de les criptes plenes existeixen petits grups d'espermatozoides dins els quals cada espermatozoide individual del grup està perfectament alineat amb la resta, existint doncs una clara organització intragrup. Per aquesta raó, en la immensa majoria de criptes apareix una zona

amb caps d'espermatozoides al costat d'una altra zona amb cues, que alhora delimita a l'altre costat amb una zona de caps (veure Fig. 105).

També la morfologia general de les cèl·lules criptals es veu modificada en funció del moment del cicle anual en el que es troben. Tant a l'inici com durant el període d'emmagatzematge, el citoplasma d'aquestes cèl·lules és ric en filaments perinuclears, conté un evident aparell de Golgi, grans vesícules secretores, lisosomes i cossos residuals (Fig. 106).

De forma esporàdica s'ha detectat algun fagòcit relativament proper a les criptes durant el període d'emmagatzematge o a l'inici de l'època de posta, ara bé, sempre lleugerament distants de l'epiteli criptal (Fig. 107).

A mesura que avança el període de posta, el nombre de cèl·lules sexuals masculines a l'interior de les criptes decreix gradualment (Fig. 108), de la mateixa manera que la quantitat de cèl·lules en proliferació cel·lular detectades amb la PCNA va minvant amb l'avanç del període d'emmagatzematge (Fig. 109).

La presència d'un important nombre d'orgànuls a l'interior de les cèl·lules que delimiten les criptes evidencia les característiques secretores de l'epiteli criptal en el període en què els espermatozoides estan emmagatzemats, mentre els oòcits estan madurant (Fig. 110). Específicament, el nombre de lisosomes, vesícules secretores i vacúols sembla incrementar a mesura que s'acosta el final de l'emmagatzematge i l'època de posta. Val a dir que en algunes micrografies s'ha pogut observar algun grànul de secreció entre les cues dels espermatozoides (Fig. 111). Aquests grànuls solen tenir una mida considerable i contenen un material de textura granulosa al seu interior.

La tinció amb una lectina determina l'existència de components glucídics. La lectina *Triticum vulgaris* (WGA) resultà tenyir lleugerament les bosses dels espermatozoides emmagatzemats dins les criptes ovàriques (Fig. 112), mentre que, tal i com s'ha detallat al capítol sobre els mascles del penegal, els espermatozoides de l'interior dels lòbuls testiculars no presenten aquestes extensions citoplasmàtiques i donen negatiu per aquesta tinció. Quan aquests arriben al conducte espermàtic s'evidencia l'existència de la bossa i una reacció positiva per a la tinció amb la citada lectina. Aquesta bossa citoplasmàtica es

detecta tant en els espermatozoides mantinguts dins de les criptes (Fig. 113) com en els que apareixen flotant lliurement pel lumen ovàric (Fig. 114). Utilitzant un fixador hipertònic i un altre d'hipotònic respecte al fixador habitual, es va acabar de demostrar l'existència d'aquestes bosses citoplasmàtiques, assegurant-nos així que no es tractava d'un artefacte provocat per problemes osmòtics (Figs. 115, 116).

Comparant les observacions de talls histològics d'ovaris al microscopi electrònic al llarg del cicle reproductiu del penegal, s'ha determinat que a mesura que s'acosta el final de l'emmagatzematge i l'inici de l'època de posta, la quantitat de material dins la bossa citoplasmàtica disminueix fins a pràcticament desaparèixer en els mesos de posta, moment en el que els oòcits ja han assolit la seva màxima maduresa. Algunes imatges evidencien l'existència de criptes amb espermatozoides sense bossa al mateix moment en què altres criptes contenen els gàmetes masculins amb masses citoplasmàtiques considerables (Fig. 117).

Finalment, durant l'època de postposta - entre els mesos d'abril i maig -, la majoria de les criptes que s'observen estan pràcticament buides i només contenen restes de material amorf (Fig. 118). A partir d'aquest moment començarà un nou cicle de formació de criptes, probablement en el moment en què la femella sigui inseminada.

L'existència de fagòcits intraepitelials en les rodalies de les criptes s'ha constatat en diferents èpoques de l'any. Les cèl·lules fagocítiques presenten un citoplasma fortament electrodens i el caràcter que les identifica més clarament és l'emissió de pseudópods, molt característics d'aquests tipus de cèl·lules. El seu nucli és de forma irregular i marcadament electrodens. Conté masses d'heterocromatina molt electrodenses, disposades de forma discontinua i adherides a l'embolcall nuclear. El citoplasma és ric en vacúols i vesícules (Fig. 119).

Aquest tipus de cèl·lules esdevenen especialment abundants al final del període de posta. Moment en el qual és freqüent observar alguns espermatozoides en fase de degradació a l'interior de les criptes (Fig. 120). Per tal d'arribar a les criptes els fagòcits travessen l'epiteli criptal gràcies a la seva enorme plasticitat (Fig. 121). Això denota una activitat fagocítica envers els

espermatozoides residuals que han quedat dins la cripta després del procés de fecundació (Fig. 122).

En aquesta mateixa època també és freqüent trobar granulòcits en les rodalies de les criptes. Aquestes cèl·lules immunològiques presenten un nucli amb la cromatina poc condensada i un citoplasma ple de grànuls electrodensos (Fig. 123). En alguns casos en el seu citoplasma s'hi poden observar les restes de la fagocitosi d'algun espermatozoide.

Un cop passada aquesta època, a l'inici del cicle, quan a les gònades comencen de nou la proliferació cel·lular - a partir del mes de maig -, es detecten només unes poques criptes, poc vascularitzades i en les quals pràcticament només hi resta material amorf (Fig. 124).

Pel que fa a les unions entre les cèl·lules criptals, durant tot el període d'emmagatzematge, la distribució i el nombre de desmosomes que uneixen les diferents cèl·lules de l'epiteli que envolta les criptes no sembla patir cap variació. Ara bé, després de la posta s'observa un decreixement en el nombre d'unions desmosòmiques i unions fortes entre les cèl·lules criptals, així com el trencament d'algunes d'elles, tal i com s'observa en la figura 125.

L'experiment utilitzant el traçador HRP (Horseradish Peroxidase) tenia com a objectiu corroborar l'aïllament que els conferien als espermatozoides les unions desmosòmiques i fortes entre les cèl·lules criptals durant tot el període d'emmagatzematge. En les diferents rèpliques de l'experiment s'esperava observar que el traçador HRP podia penetrar en els espais intercel·lulars, però que les unions desmosòmiques entre les cèl·lules criptals no permetien l'entrada del traçador cap a l'interior de les criptes. Malgrat que el resultat final sota el microscopi òptic no va ser suficientment concloent (Fig. 126), en les rèpliques de l'experiment al microscopi electrònic sí que s'intueix que el traçador (més fosc) només penetra fins al límit que marquen els desmosomes (Figs. 127 i 128), els quals acomplirien la funció d'aïllar completament els espermatozoides durant tot el període d'emmagatzematge.

L'explicació més plausible del perquè no vam obtenir de forma clara els resultats esperats tot i les múltiples rèpliques realitzades, és que els peixos, durant el transcurs de l'experiment, no podien ser mantinguts en les condicions

fisiològiques òptimes per ells, de manera que les seves funcions vitals es veien fortament afectades.

Làmina XIII: Estructura ovàrica:

Fig. 57. Morfologia externa dels ovaris de l'espècie en estudi. m: mesovarium; →: oviducte.

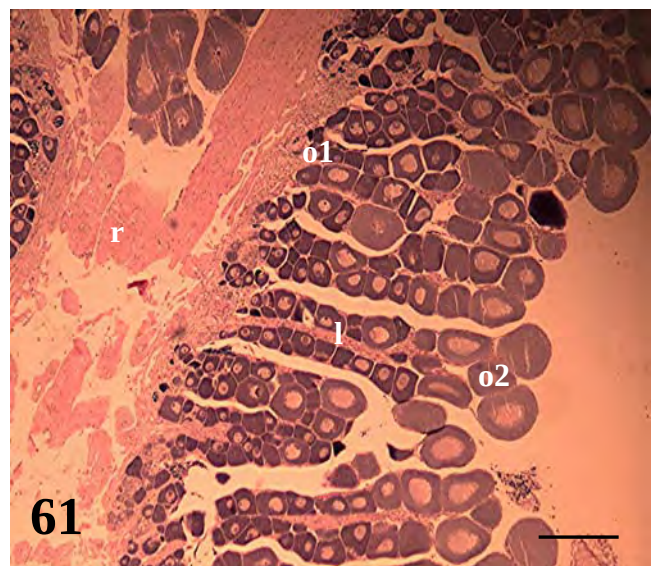
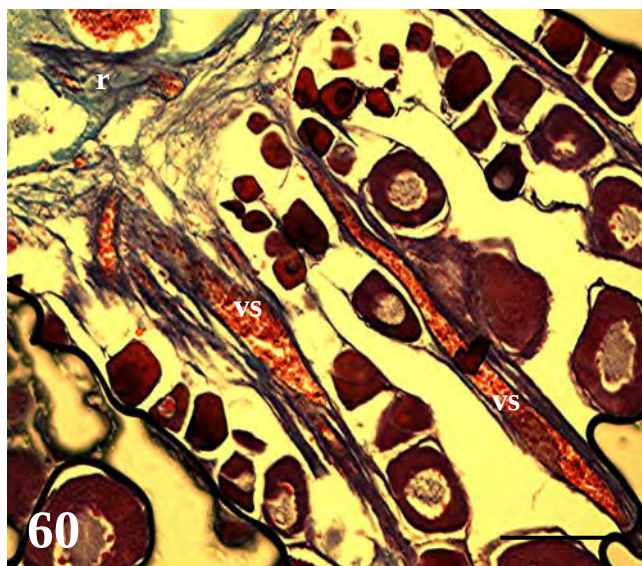
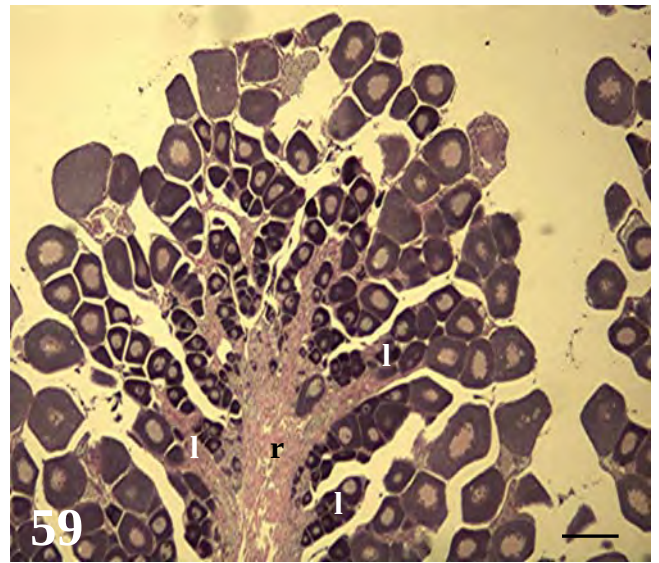
Fig. 58. Ovaris en època de post-posta on s'observa el raquis (de color més fosc) que el creua longitudinalment . →: raquis central.

Fig. 59. Visió general de l'estructura ovàrica en un tall longitudinal. l: lamel·les; r: raquis central. Blau de toluidina. Barra= 150 µm.

Fig. 60. Troncs fibromusculars molt irrigats que sostenen les lamel·les ovàriques. r: raquis; vs: vas sanguini. Mallory. Barra= 100 µm.

Fig. 61. Imatge on es mostra que els oòcits es situen en estat de maduració creixent a mesura que ens allunyem del raquis central. o1: oogònies; o2: oòcits; l: lamel·la ovàrica; r: raquis. Blau de toluidina. Barra= 100 µm.

Làmina XIII: Estructura ovàrica:



Làmina XIV: Estructura ovàrica:

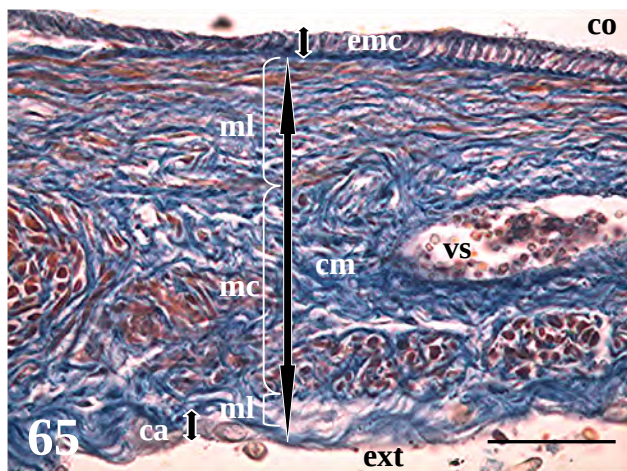
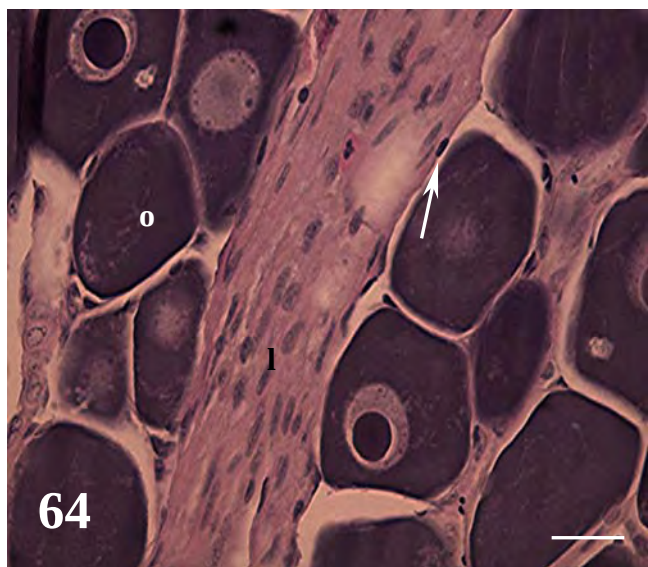
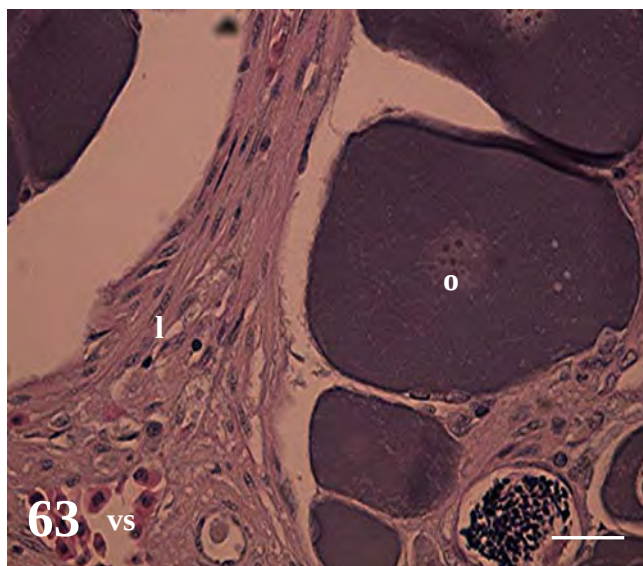
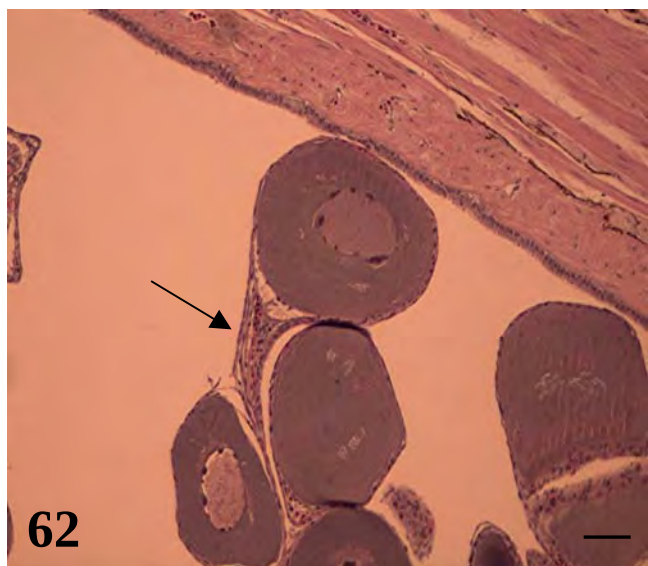
Fig. 62. Peduncle que sosté un oòcit. →: peduncle. Hematoxilina-Eosina. Barra= 50 µm.

Fig. 63. Base d'una lamel·la ovàrica. l: lamel·la; o: oòcit; vs: vas sanguini. Hematoxilina-Eosina. Barra= 20 µm.

Fig. 64. Fotografia on s'evidencia l'epiteli monoestratificat que delimita les lamel·les ovàriques. l: lamel·la; o: oòcit; →: epiteli monoestratificat. Hematoxilina-Eosina. Barra= 20 µm.

Fig. 65. Les capes musculars de la paret ovàrica presenten molts vasos sanguinis. ca: cèl·lules aplanades; cm: capa muscular; co; cavitat ovàrica; emc: epiteli monoestratificat cúbic; ext: exterior; mc: musculatura circular; ml: musculatura longitudinal; vs: vas sanguini. Mallory. Barra= 50 µm.

Làmina XIV: Estructura ovàrica:



Làmina XV: Estructura ovàrica. Criptes:

Figs. 66 i 67. Visió general de l'ovari on s'observa que les criptes es troben a la base de les lamel·les ovàriques. r: raquis central. →: criptes. Hematoxilina-Eosina. Barra= 150 µm i 20 µm.

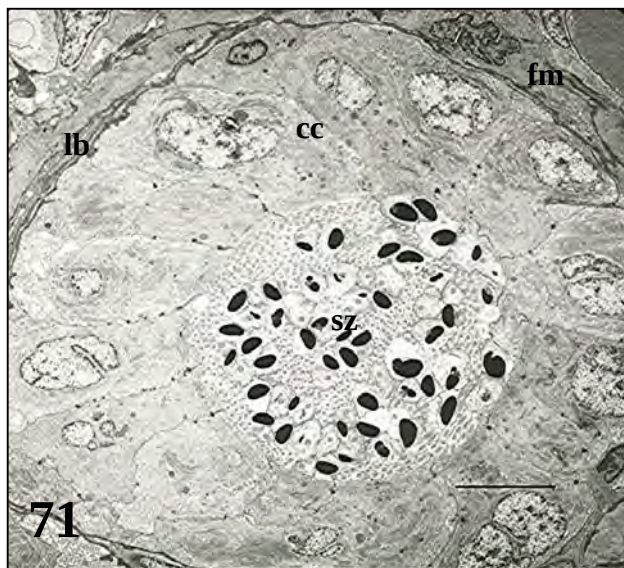
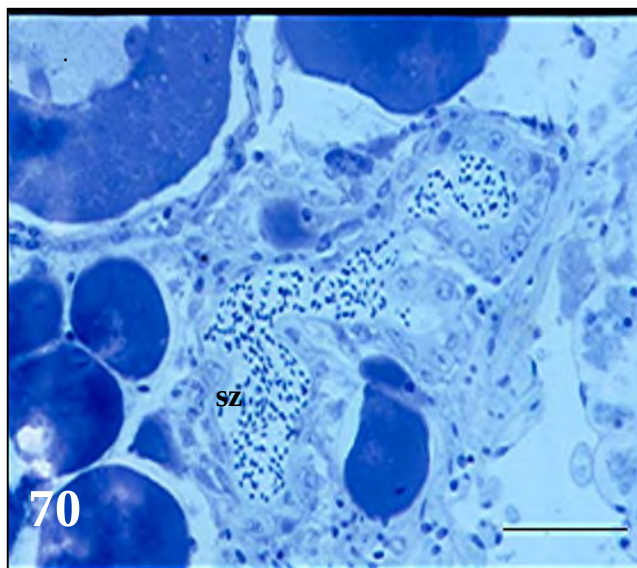
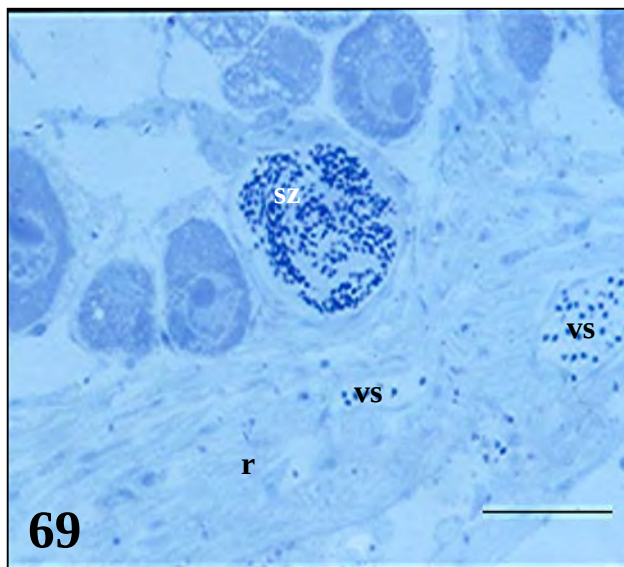
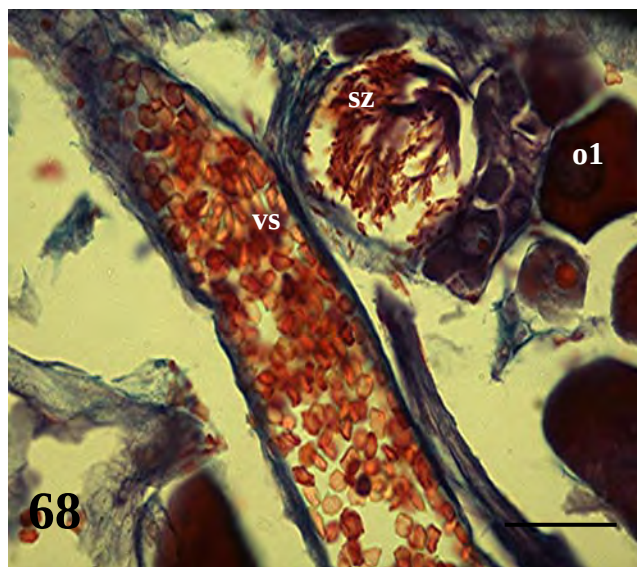
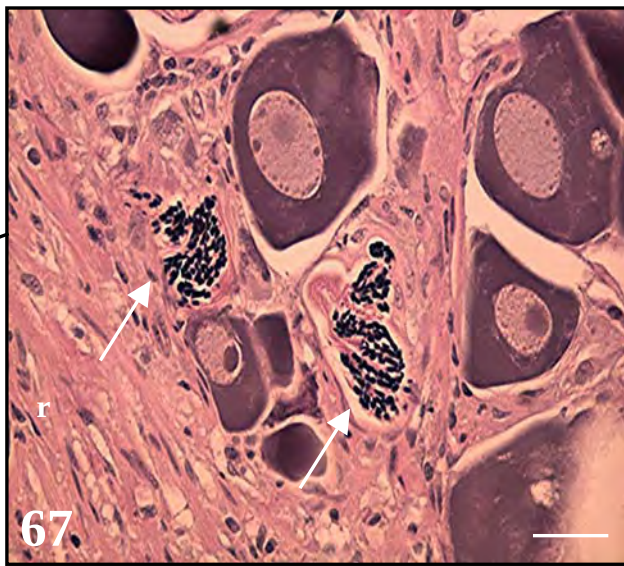
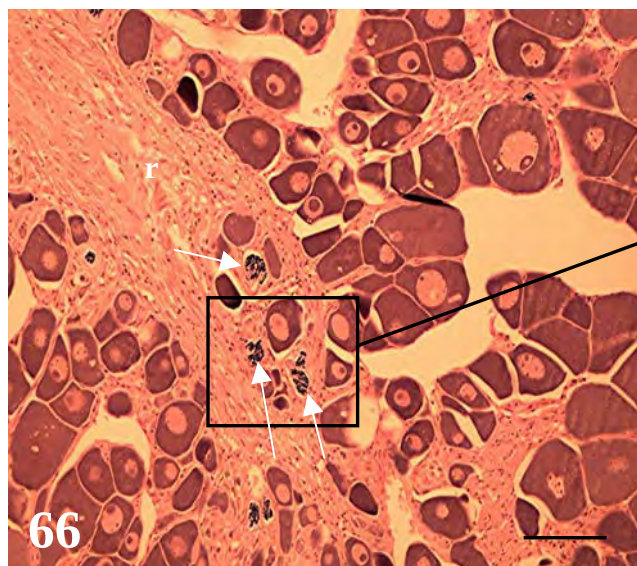
Fig. 68. Les criptes d'emmagatzematge se situen a la base de les lamel·les, sovint properes a vasos sanguinis. o1: oogònies; sz: espermatozoides; vs: vas sanguini. Mallory. Barra= 50 µm.

Fig. 69. Les criptes solen presentar una morfologia arrodonida o lleugerament el·líptica. sz: espermatozoides; r: raquis; vs: vas sanguini. Blau de Toluidina. Barra= 50 µm.

Fig. 70. Quan dues o més criptes es troben de costat poden fusionar-se i presentar morfologies molt irregulars. sz: espermatozoides. Blau de Toluidina. Barra= 50 µm.

Fig. 71. Imatge al microscopi electrònic d'una cripta en la que distingim els components de l'epiteli criptal. cc: cèl·lules criptals; lb: làmina basal; fm: fibres musculars; sz: espermatozoides. Barra= 20 µm.

Làmina XV: Estructura ovàrica. Criptes:

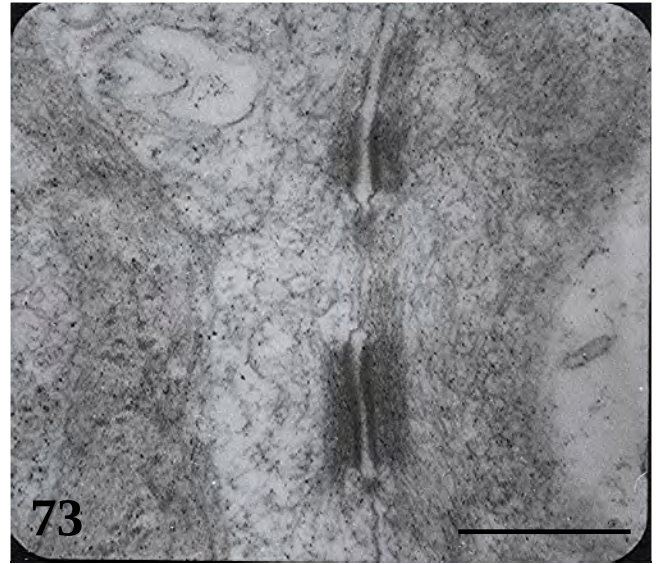
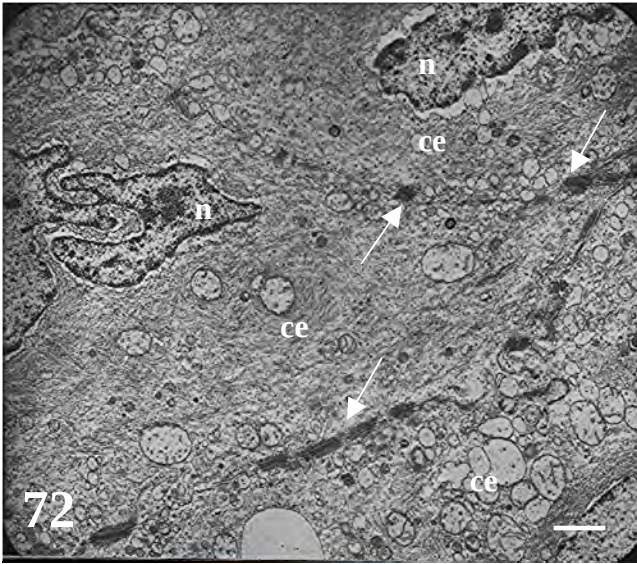


Làmina XVI: Estructura ovàrica. Criptes:

Fig. 72. Electromicrografia on s'observen els nombrosos desmosomes que uneixen les cèl·lules epitelials d'entorn les criptes. ce: cèl·lules epitelials; n: nuclis; →: desmosomes. Barra= 10 μ m.

Fig. 73. Imatge a més augment dels desmosomes que uneixen les cèl·lules. Barra= 2 μ m

Làmina XVI: Estructura ovàrica. Criptes:



Làmina XVII: Cicle anual de la gònada. Canvis macroscòpics:

Fig. 74. Secció transversal d'un ovari en el mes de maig. Noti's que la secció transversal és perfectament rodona.

Fig. 75. Ovari de color rosat semi-transparent recol·lectat en el mes de maig.

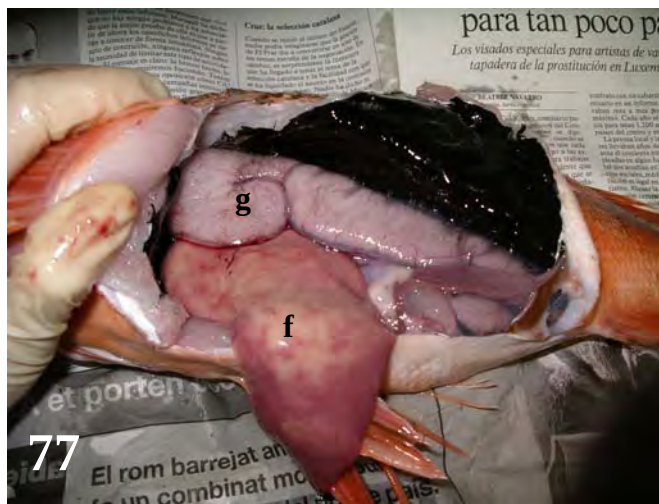
Fig. 76. Ovaris del mes de novembre en els que el color groc pàl·lid dels òvuls que conté li donen un to groguenc.

Fig. 77. Fotografia on podem observar el considerable augment de volum que experimenten els ovaris en els mesos previs a la posta.

Fig. 78. Secció transversal d'un ovari en el mes de febrer.

Fig. 79. Ovaris del mes de març. Aquest to translúcid és degut a la clarificació del vitel.

Làmina XVII: Cicle anual de la gònada. Canvis macroscòpics:



Làmina XVIII: Cicle anual de la gònada. Canvis macroscòpics:

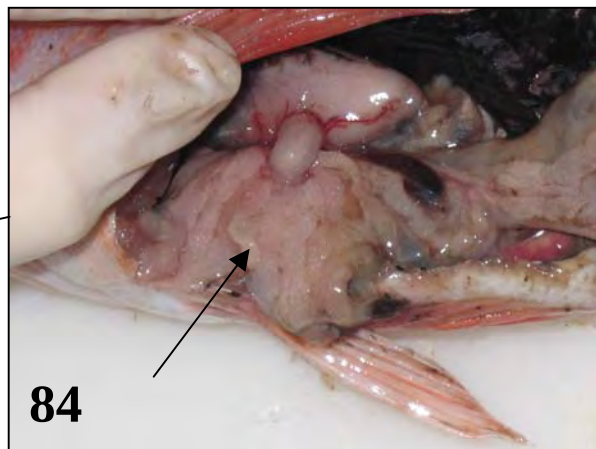
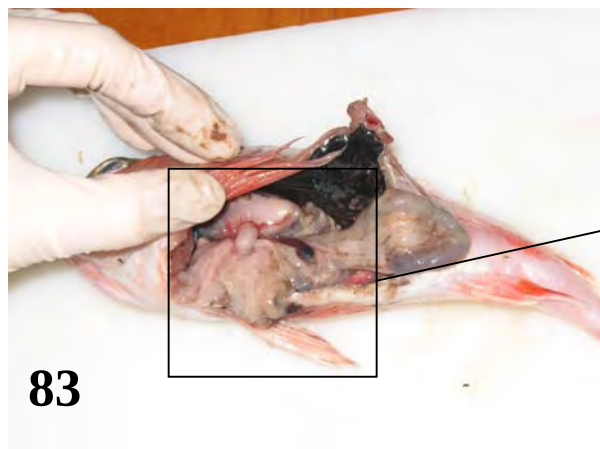
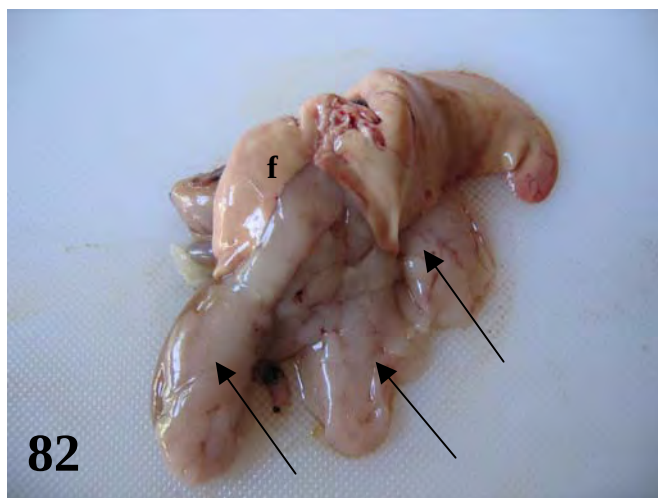
Fig. 80. Ovaris del mes d'abril que ja han alliberat la posta i tornen a començar un nou cicle.

Fig. 81. Evolució anual de les seccions transversals de femelles d'*Helicolenus dactylopterus* de longituds estàndard entre 167 i 201 mm. Abril, juny, febrer.

Fig. 82. Reserves de greix entorn les vísceres d'un individu pescat el mes de juny. →: greix.

Figs. 83 i 84. Reserves de greix visceral d'un espècimen capturat el mes de juliol. →: greix.

Làmina XVIII: Cicle anual de la gònada. Canvis macroscòpics:



Làmina XIX: Canvis histològics dels ovaris:

Fig. 85. Oogònia. Hematoxilina-Eosina. Barra = 20 µm.

Fig. 86. Oòcit en l'estadi cromatina- nucleolar. Hematoxilina-Eosina. Barra = 20 µm.

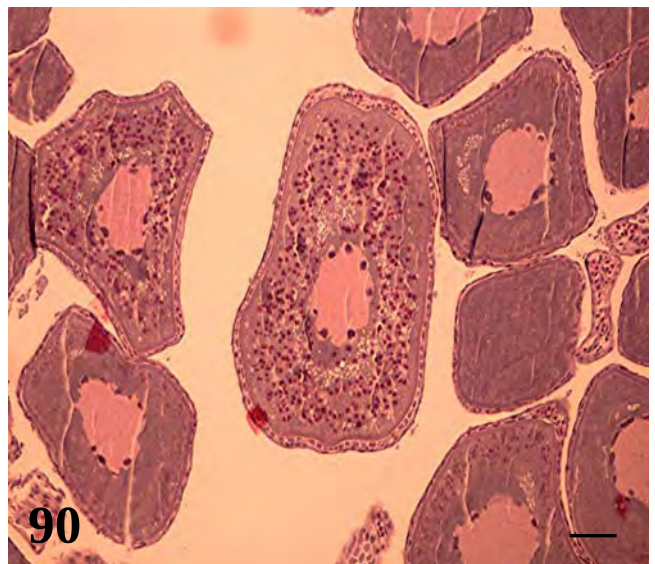
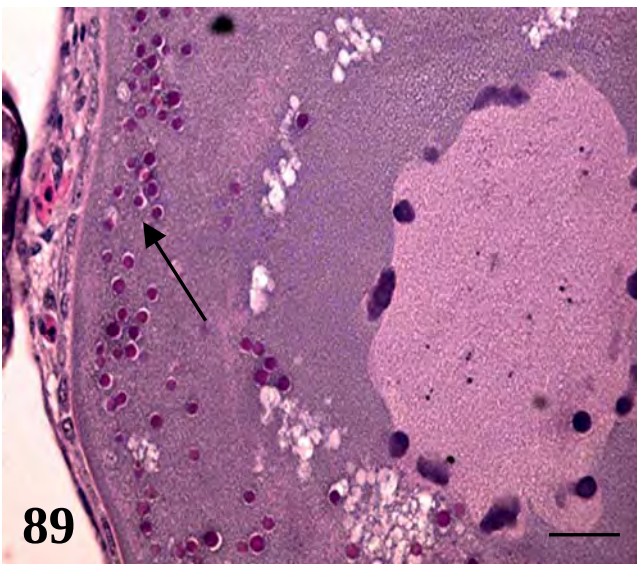
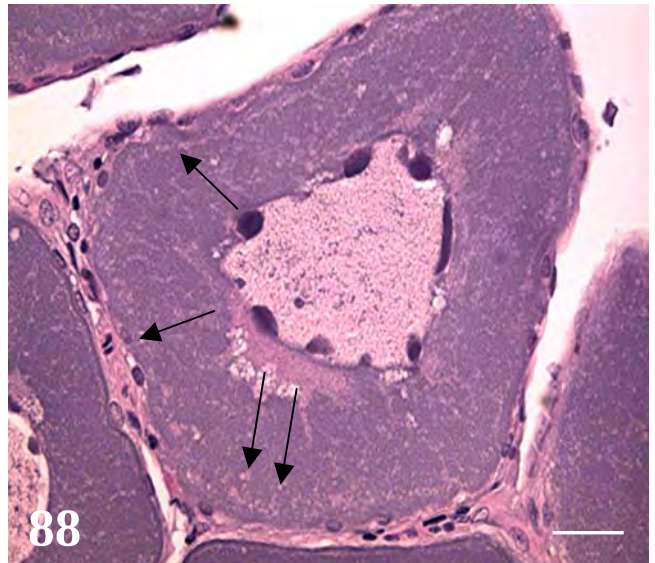
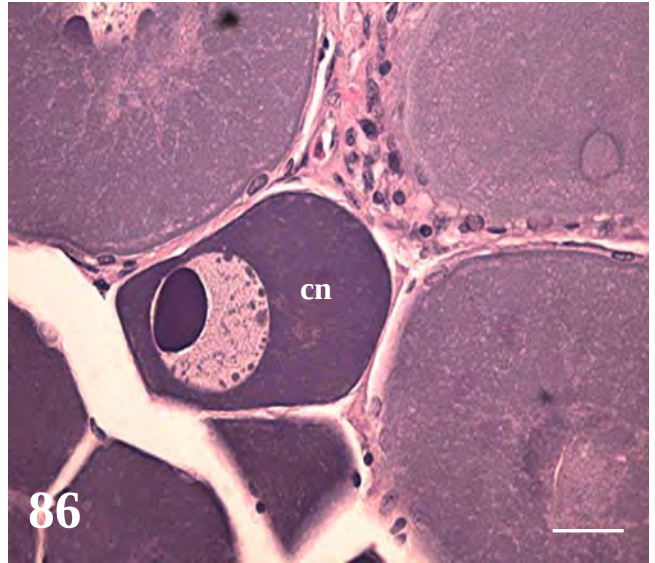
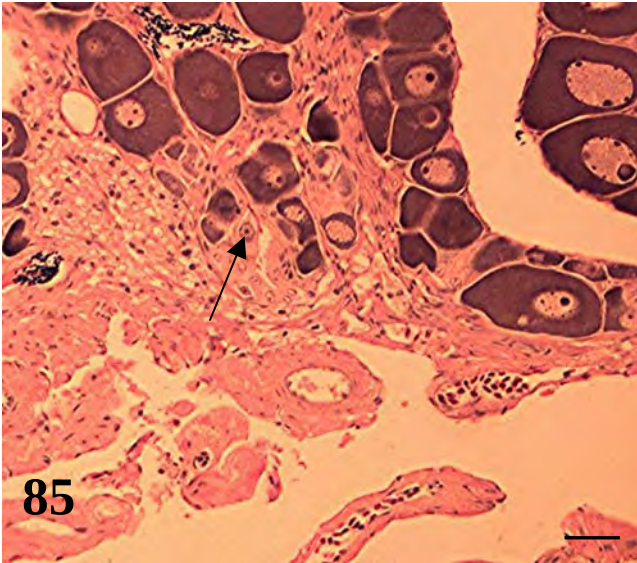
Fig. 87. Oòcit en l'estadi perinucleolar. Hematoxilina-Eosina. Barra = 20 µm.

Fig. 88. Oòcit en l'estadi d'alvèols corticals. →: alvèols corticals. Hematoxilina-Eosina. Barra = 20 µm.

Fig. 89. Detall del citoplasma d'un oòcit amb grànuls de vitel. →: grànuls de vitel. Hematoxilina-Eosina. Barra = 20 µm.

Fig. 90. Progressivament els grànuls de vitel citoplasmàtics dels oòcits van augmentant en nombre. Hematoxilina-Eosina. Barra = 50 µm.

Làmina XIX: Canvis histològics dels ovaris:

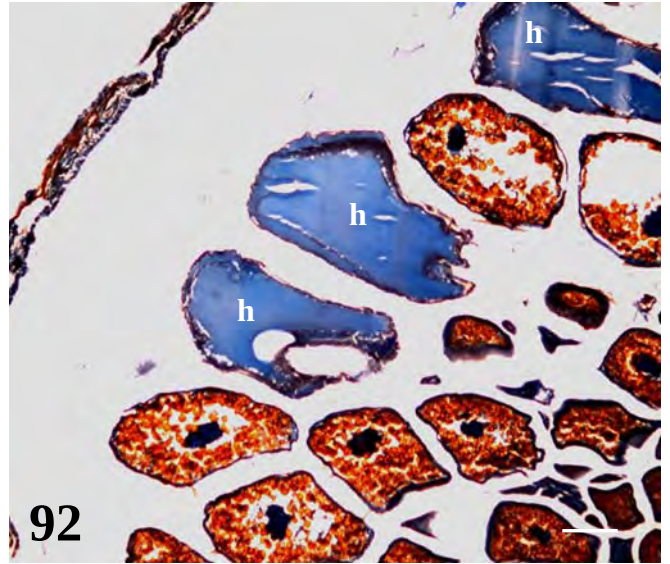
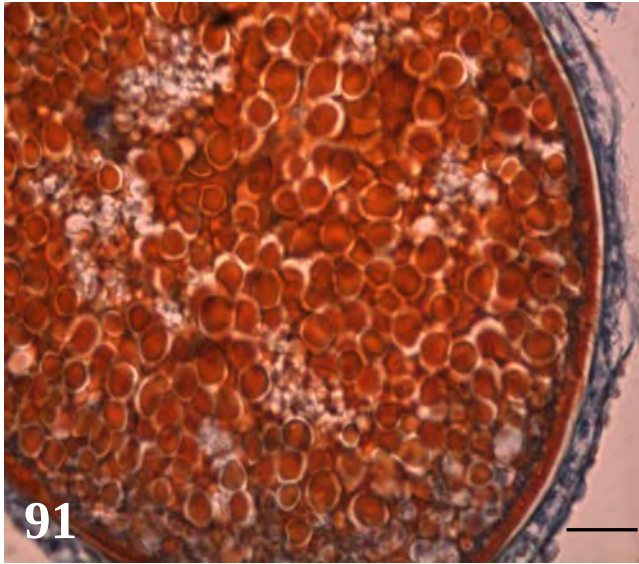


Làmina XX: Canvis histològics dels ovaris:

Fig. 91. Oòcit en un estadi vitel·logènic més avançat en el que el citoplasma conté una enorme quantitat de grànuls de vitel. Mallory. Barra = 20 µm.

Fig. 92. Imatge on s'observen varis oòcits hidratats. h: oòcit hidratat. Mallory. Barra 20 µm.

Làmina XX: Canvis histològics dels ovaris:



Làmina XXI: Canvis histològics de les criptes:

Fig. 93. Les oogònies primàries foren les cèl·lules el nucli de les quals resultà més fortament tenyit amb la tècnica de la PCNA. o1: oogònies. Barra= 100 µm.

Fig. 94. Espermatozoides a l'espai interlamel·lar a punt de ser englobats per formar una cripta. ei: espai interlamel·lar. Hematoxilina-Eosina. Barra = 20 µm.

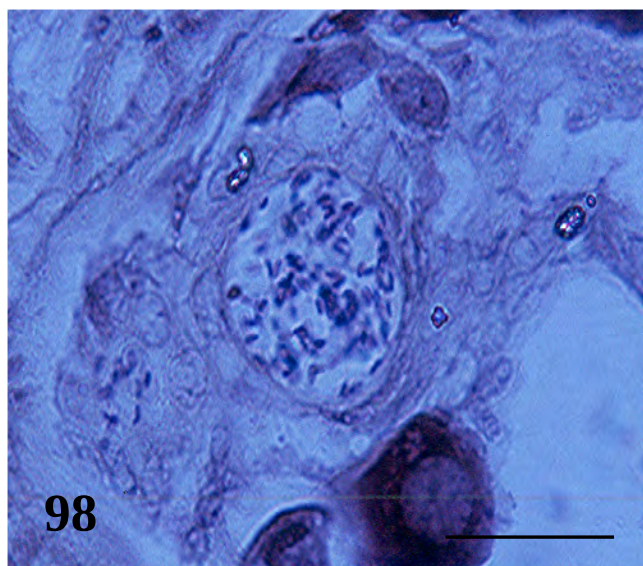
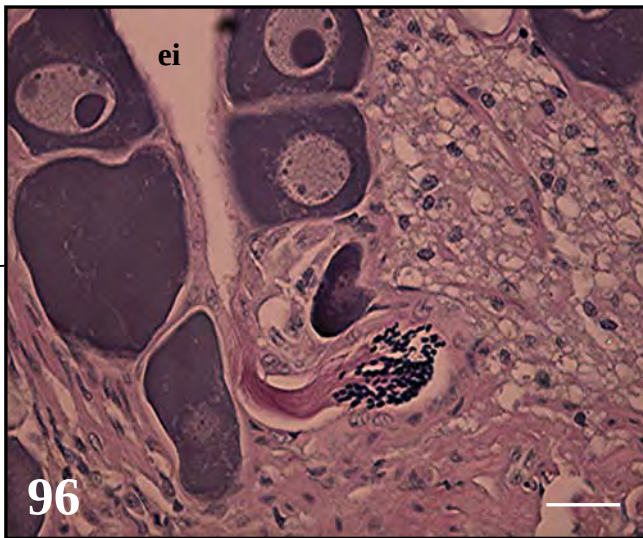
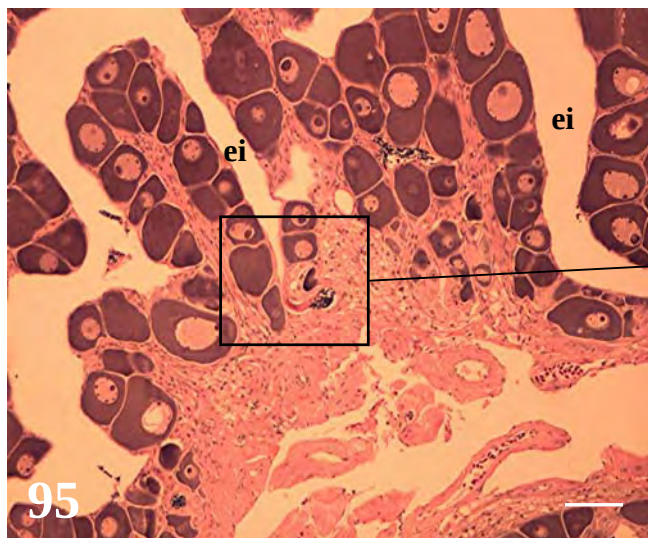
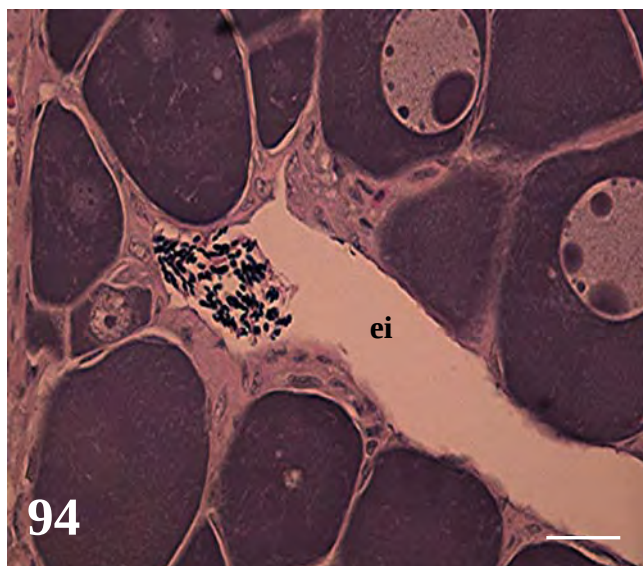
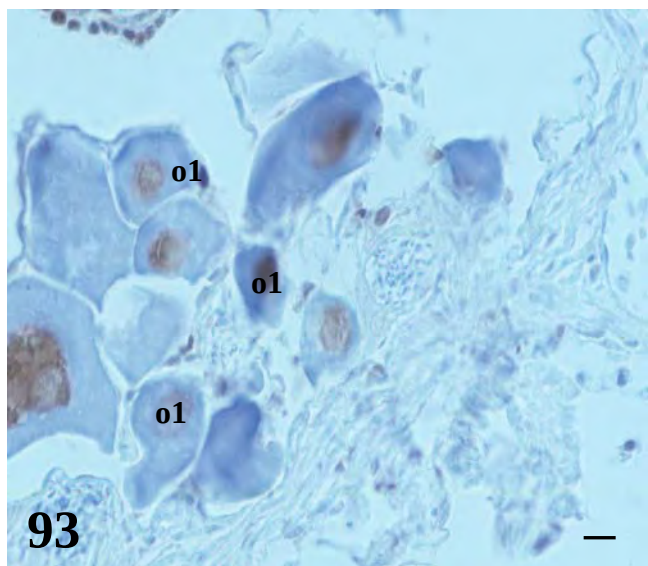
Fig. 95. Espermatozoides a l'espai interlamel·lar a punt de ser englobats per formar una cripta. ei: espai interlamel·lar. Hematoxilina-Eosina. Barra= 150 µm.

Fig. 96. Imatge a més augment dels espermatozoides a punt de ser englobats per l'epiteli lamel·lar. ei: espai interlamel·lar. Hematoxilina-Eosina. Barra = 20 µm.

Fig. 97. Imatge d'una mostra de maig on veiem que la proliferació cel·lular entorn les criptes és considerable. →: cèl·lules marcades. PCNA. Barra= 100 µm.

Fig. 98. Quan el nombre de cèl·lules sexuals masculines és baix, els espermatozoides semblen estar distribuïts a l'atzar. Blau de toluidina. Barra= 50 µm.

Làmina XXI: Formació de les criptes:



Làmina XXII: Canvis histològics de les criptes:

Fig. 99. Al llarg del període d'emmagatzematge, les criptes semblen ser cada vegada més abundants. →: criptes. Hematoxilina-Eosina. Barra= 150 µm.

Fig. 100. Cripta plena d'espermatozoides en el període final de l'emmagatzematge. sz: espermatozoides. Hematoxilina-Eosina. Barra = 20 µm.

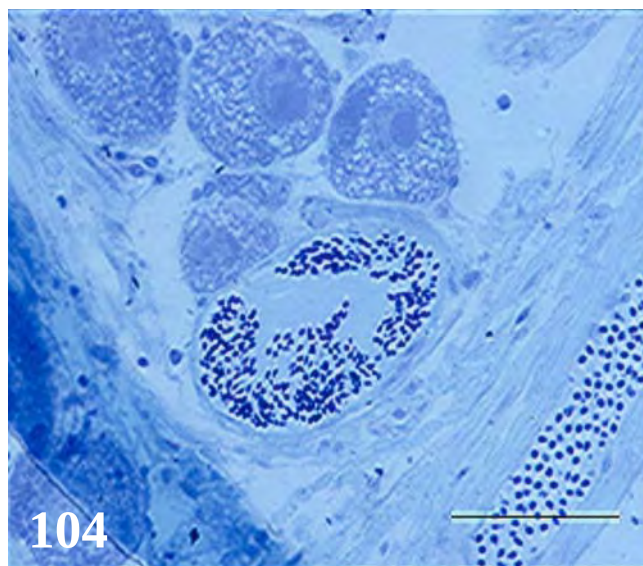
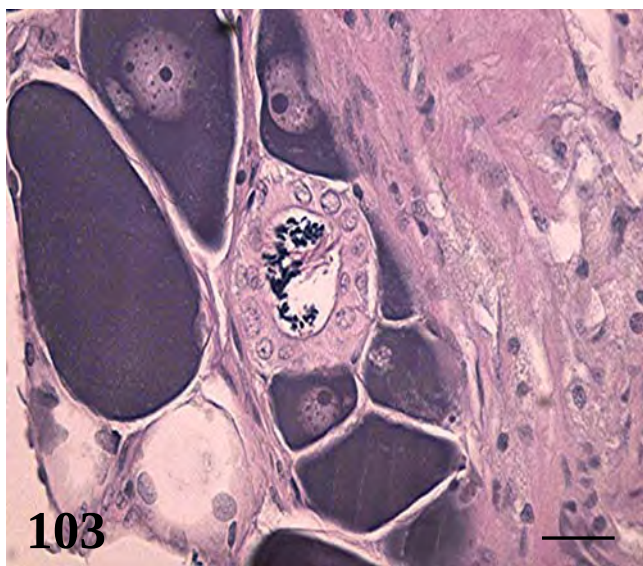
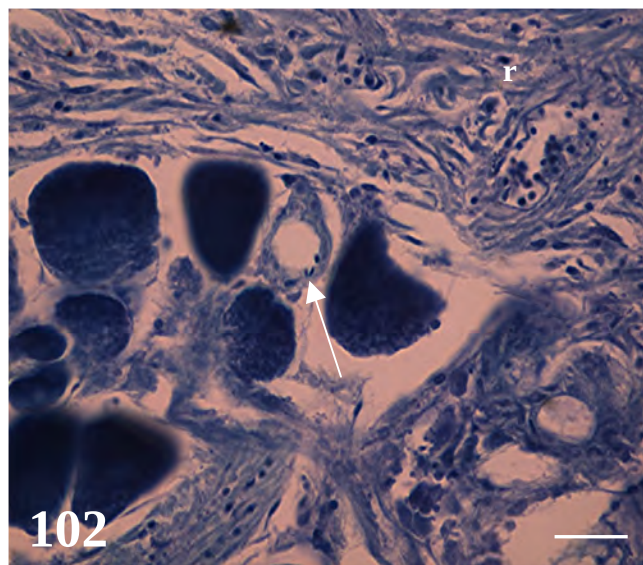
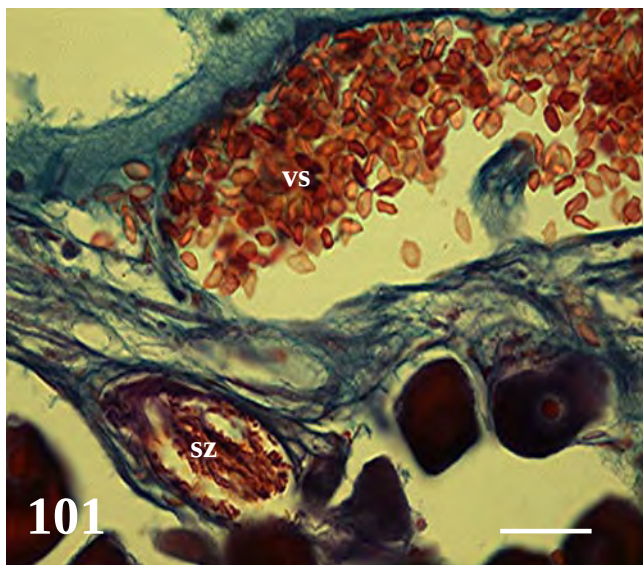
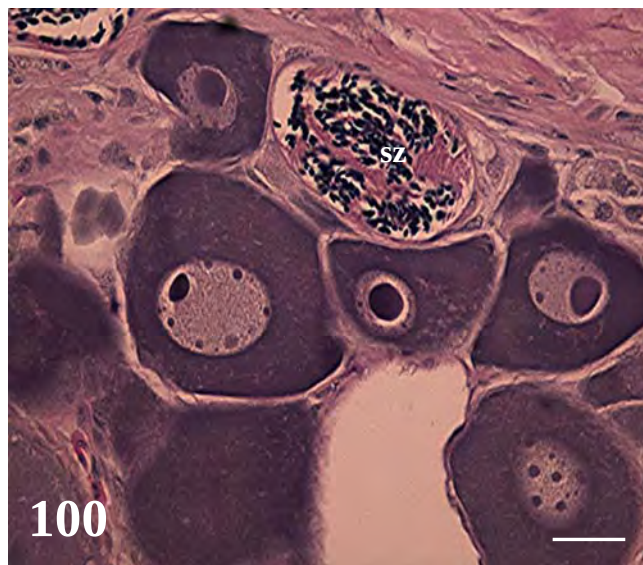
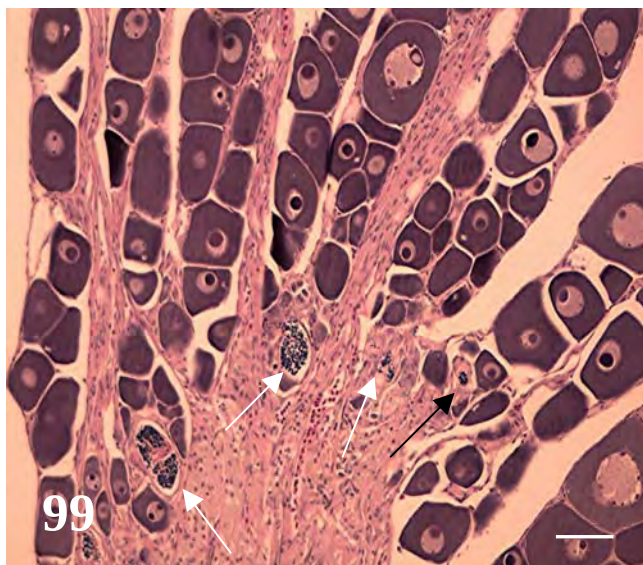
Fig. 101. Imatge al microscopi òptic on s'observa la proximitat a la que es troben les criptes respecte els vasos sanguinis durant el període d'emmagatzematge. sz: espermatozoides; vs: vas sanguini. Mallory. Barra= 50 µm.

Fig. 102. Cripta buida detectada en l'època de post-posta. r: raquis; →: cripta. Blau de toluidina. Barra = 20 µm.

Fig. 103. Cripta contenint un baix nombre d'espermatozoides al seu interior. Hematoxilina-Eosina. Barra = 20 µm.

Fig. 104. Quan els nombre d'espermatozoides augmenta, sembla que es veuen obligats a compactar-se i alinear-se mínimament. Blau de toluidina. Barra= 50 µm.

Làmina XXII: Canvis histològics de les criptes:



Làmina XXIII: Canvis histològics de les criptes:

Fig. 105. Imatge al microscopi electrònic on s'observa certa organització dels espermatozoides, existint una zona de caps i una zona de cues. cc: cèl·lules criptals; sz: espermatozoides. Barra= 10 µm.

Fig. 106. Citoplasma d'una cèl·lula criptal durant el període d'emmagatzematge. ag: aparell de Golgi; l: lisosoma; m: mitocondris; mp: membrana plasmàtica; re: reticle endoplasmàtic; v: vesícules. Barra= 10 µm.

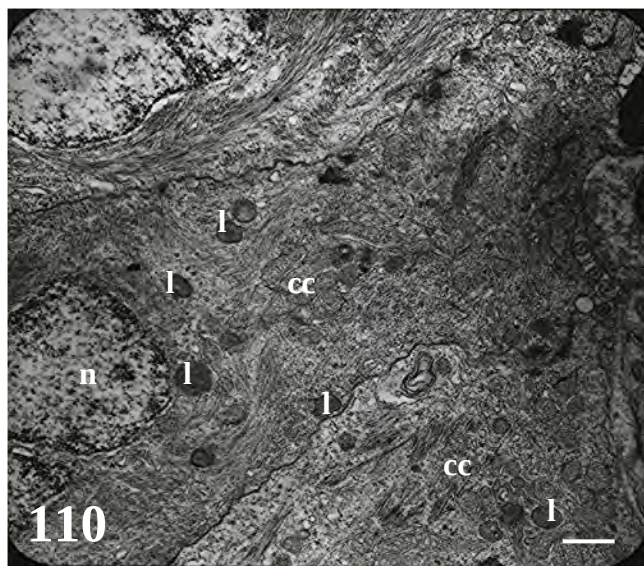
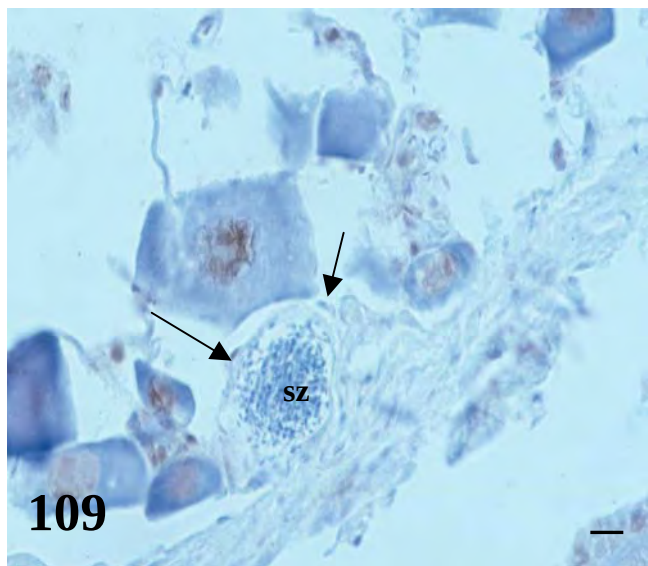
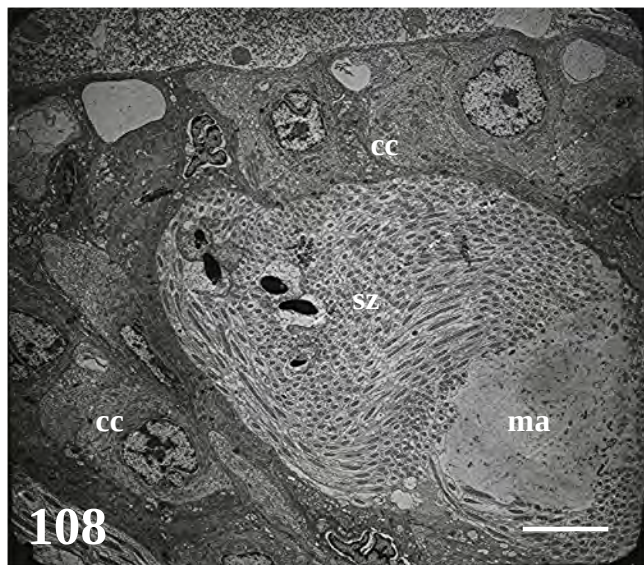
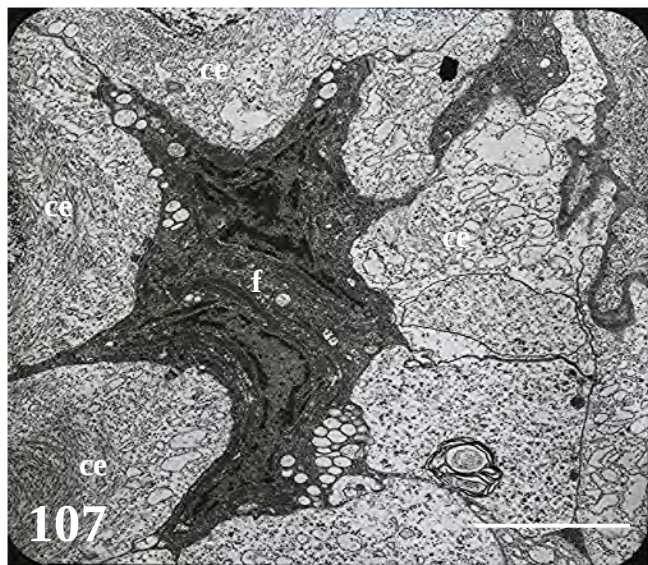
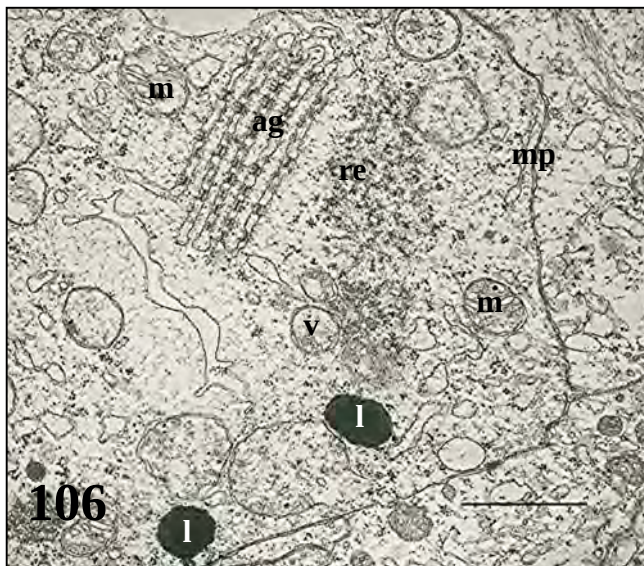
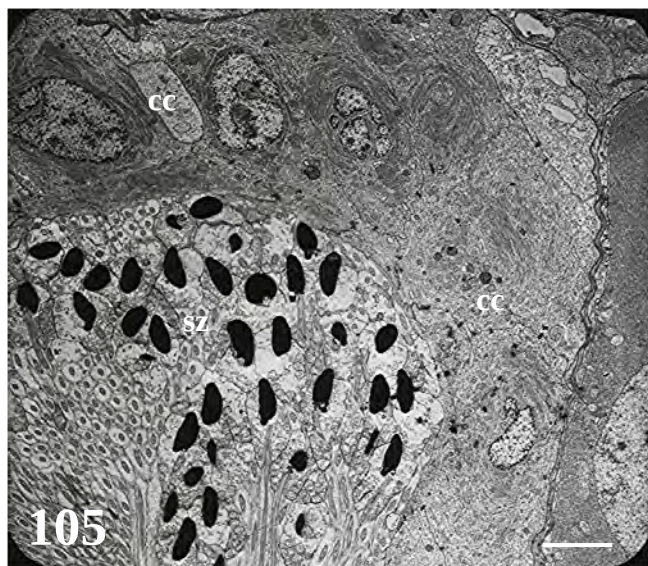
Fig. 107. Durant l'època de post-posta podem trobar alguns fagòcits intraepitelials pels voltants de les criptes d'emmagatzematge. ce: cèl·lula epitelial; f: fagòcit. Barra= 10 µm.

Fig. 108. A mesura que s'aproxima l'època de post-posta el nombre d'espermatozoides de l'interior de les criptes va disminuint. cc: cèl·lula criptal; ma: material amorf; sz: espermatozoides. Barra= 20 µm.

Fig. 109. Imatge d'una cripta del mes de desembre. Noti's la poca proliferació cel·lular que es dona en aquesta època propera a la posta. sz: espermatozoides; →:epiteli criptal. PCNA. Barra= 100 µm.

Fig. 110. Imatge al microscopi electrònic on veiem el citoplasma de dues cèl·lules criptals contenint molts lisosomes. cc: cèl·lula criptal; l: lisosoma; n: nucli. Barra= 10 µm.

Làmina XXIII: Canvis histològics dels espermatozoides emmagatzemats
dins les criptes:



Làmina XXIV: Canvis histològics de les criptes:

Fig. 111. Micrografia on s'observa el que sembla ser un grànul de secreció entre les cues dels espermatozoides en el mes de novembre. cc: cèl·lula criptal; d: demosoma; gs: grànul de secreció; sz: espermatozoides. Barra= 5 µm.

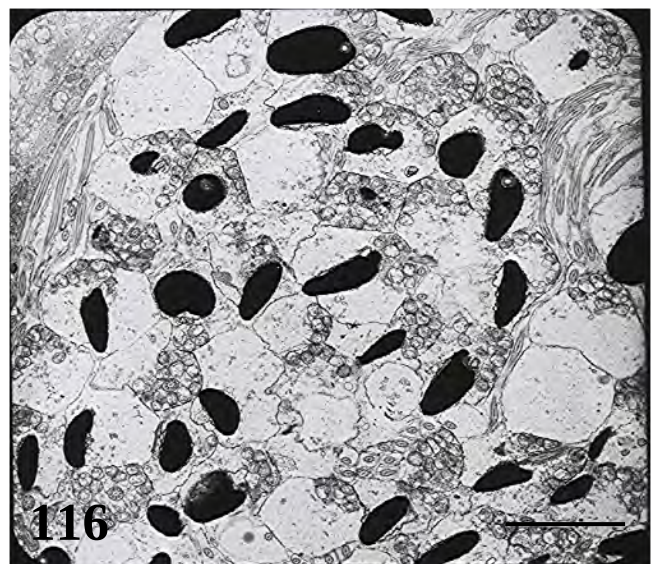
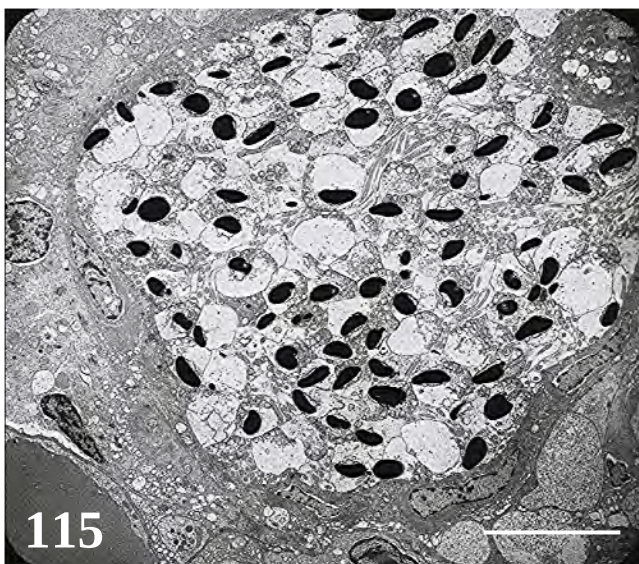
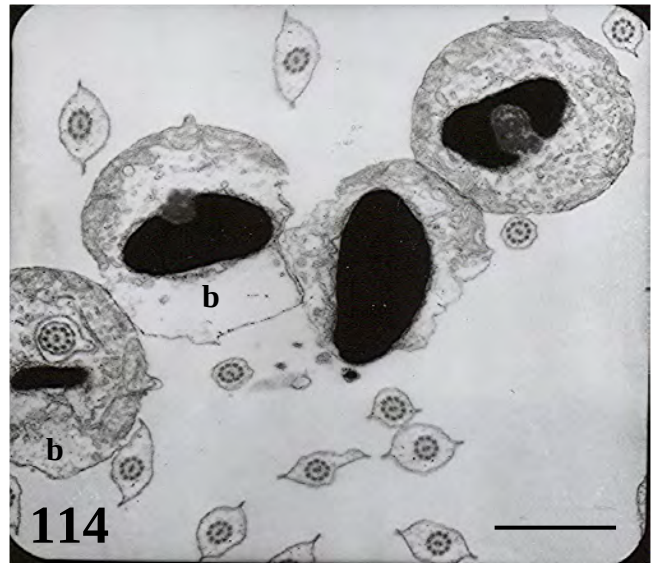
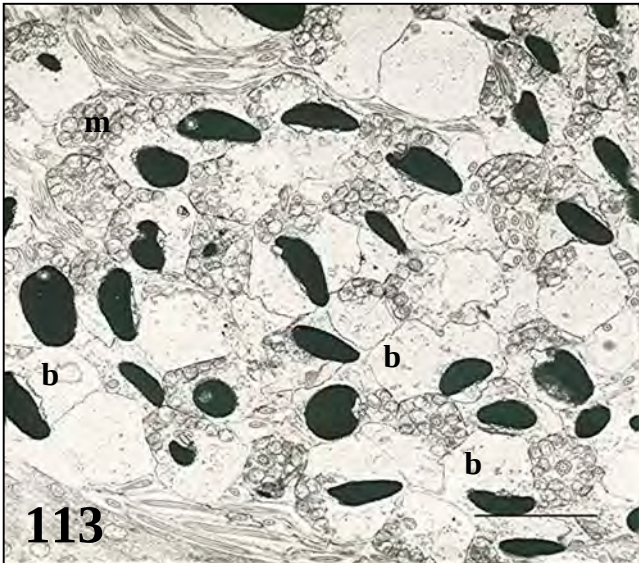
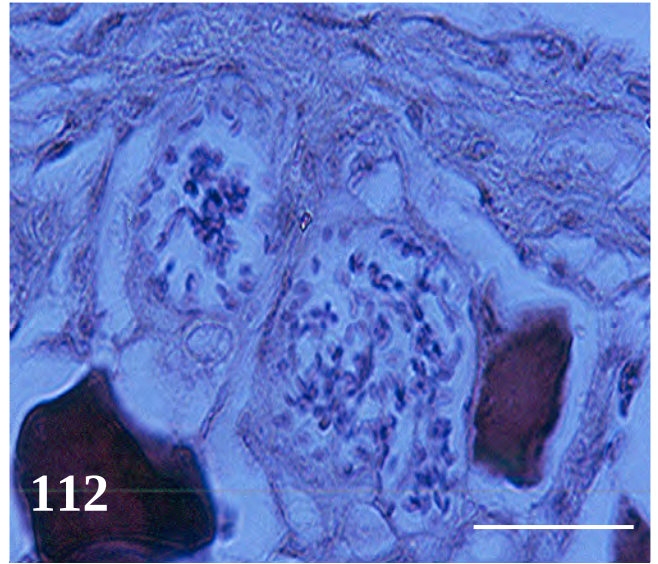
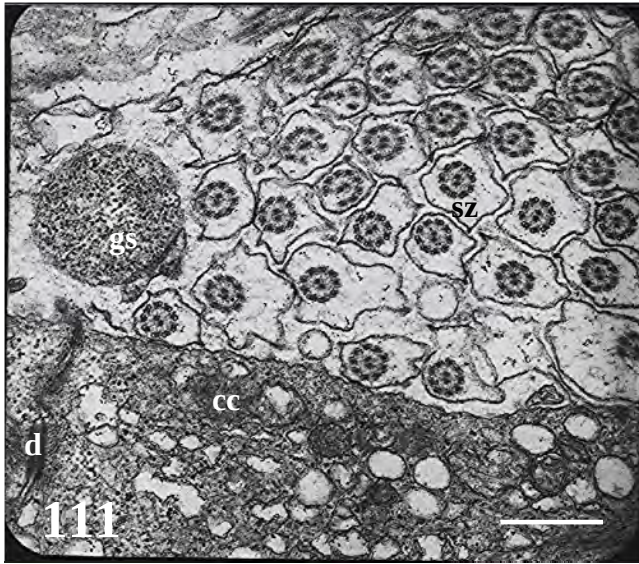
Fig. 112. Imatge de la tinció amb la lectina *Triticum vulgaris* (WGA) on s'intueix que les bosses dels caps dels espermatozoides resultaren lleugerament tenyides d'un to marronós clar. Oli d'immersió. Barra= 50 µm.

Fig. 113. Espermatozoides capturats dins les criptes d'emmagatzematge. b: bossa citoplasmàtica; m: mitocondris dels espermatozoides. Barra= 10 µm.

Fig. 114. Espermatozoides flotant lliurement per l'espai interlamel·lar. b: bossa citoplasmàtica. Barra= 5 µm.

Figs. 115 i 116 . Imatge al microscopi electrònic d'una cripta fixada amb un fixador hipotònic i un fixador hipertònic, respectivament. Noti's que la bossa citoplasmàtica segueix present entorn els caps dels espermatozoides en ambdós casos. Barra= 20 µm i 10 µm.

Làmina XXIV: Canvis histològics dels espermatozoides
emmagatzemats dins les criptes:



Làmina XXV: Canvis histològics de les criptes:

Fig. 117. Imatge al microscopi electrònic de dues criptes del mes de gener on veiem a l'esquerra espermatozoides sense bossa i a la dreta uns altres que encara la mantenen. Barra= 20 μm .

Fig. 118. Imatge d'una cripta a l'època de post-posta on s'observa que només hi queden espermatozoides residuals i material amorf. cc: cèl·lula criptal; ma: material amorf; sz: espermatozoides. Barra= 10 μm .

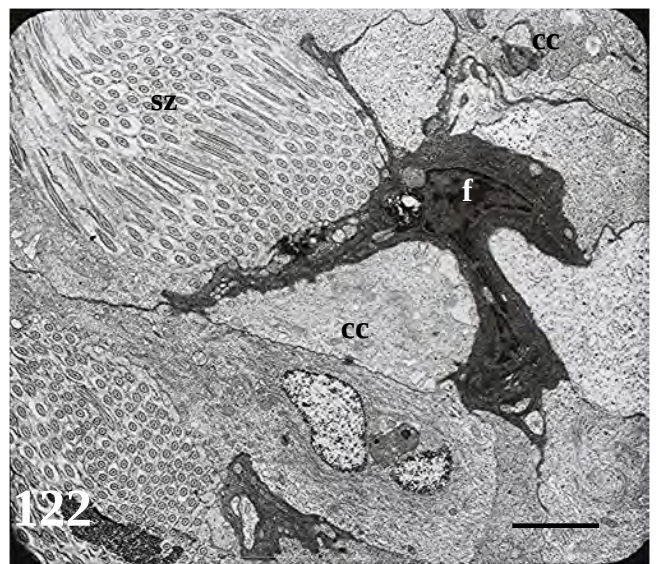
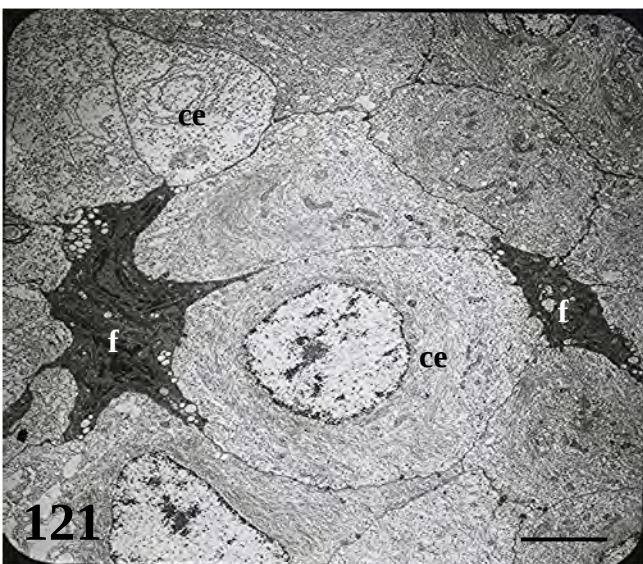
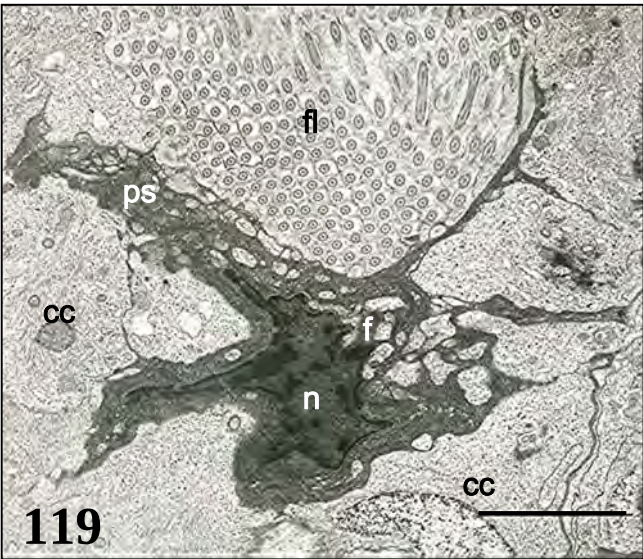
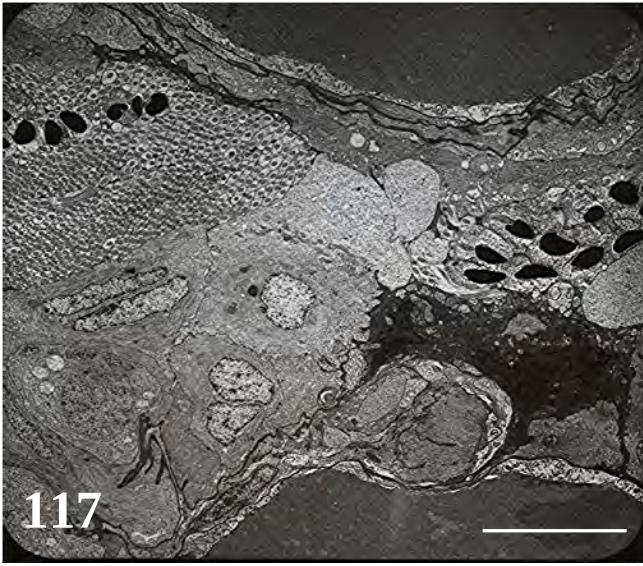
Fig. 119. Estructura d'una cèl·lula fagocítica. cc: cèl·lula criptal; f: fagòcit; fl: flagels; n: nucli; ps: pseudòpodes. Barra= 10 μm .

Fig. 120. Espermatozoide en degradació dins una cripta entorn la qual existeix un fagòcit. szd: espermatozoide en degradació. Barra= 2 μm .

Fig. 121. Les cèl·lules fagocítiques travessen les cèl·lules epitelials i l'epiteli criptal gràcies a la seva enorme plasticitat. ce: cèl·lula epitelial; f: fagòcit. Barra= 10 μm .

Fig. 122. Fagòcit intraepitelial situat just al límit d'una cripta plena d'espermatozoides al final de l'època de posta. cc: cèl·lules criptals; f: fagòcit; sz: espermatozoides. Barra= 10 μm .

Làmina XXV: Canvis histològics dels espermatozoides
emmagatzemats dins les criptes:



Làmina XXVI: Canvis histològics de les criptes:

Fig. 123. Ultraestructura d'un granulòcit. g: grànuls electrodensos; n: nucli; →: restes de la digestió d'un espermatozoide. Barra= 10 µm.

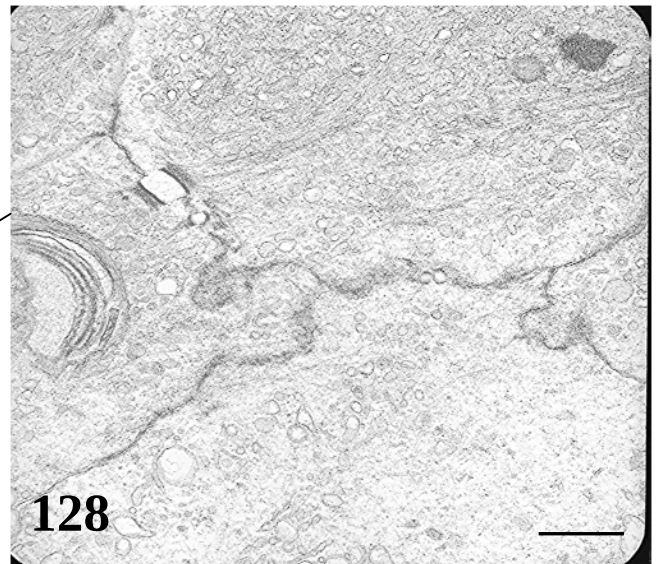
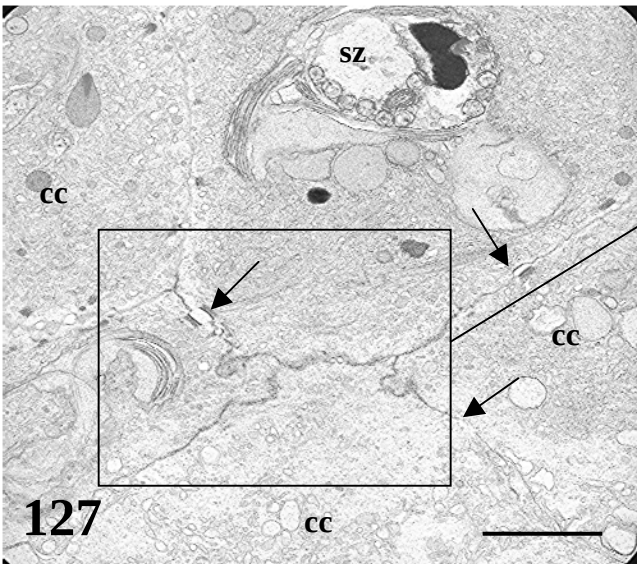
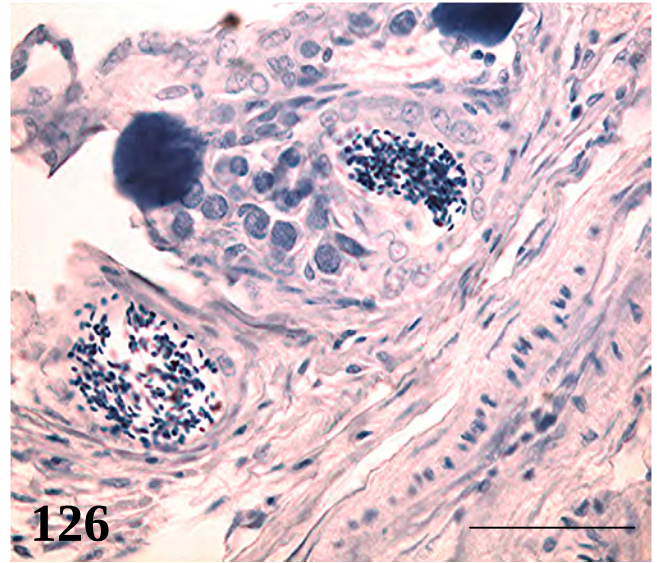
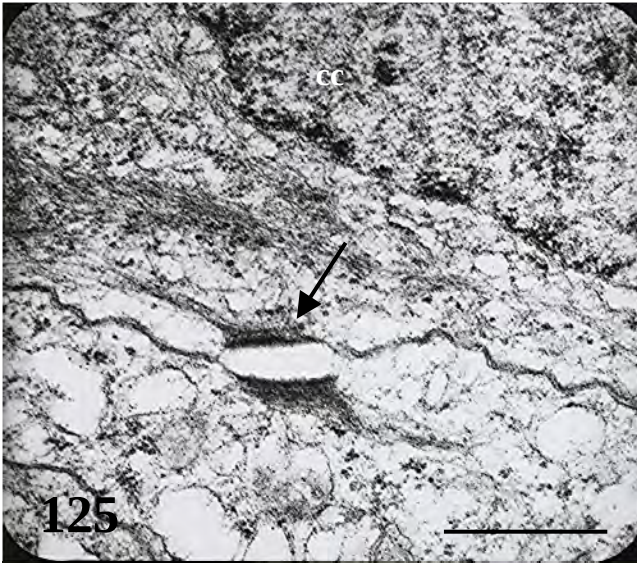
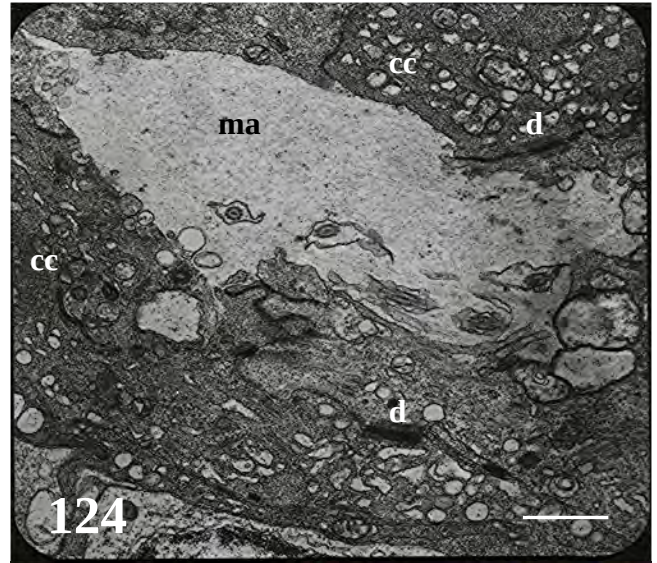
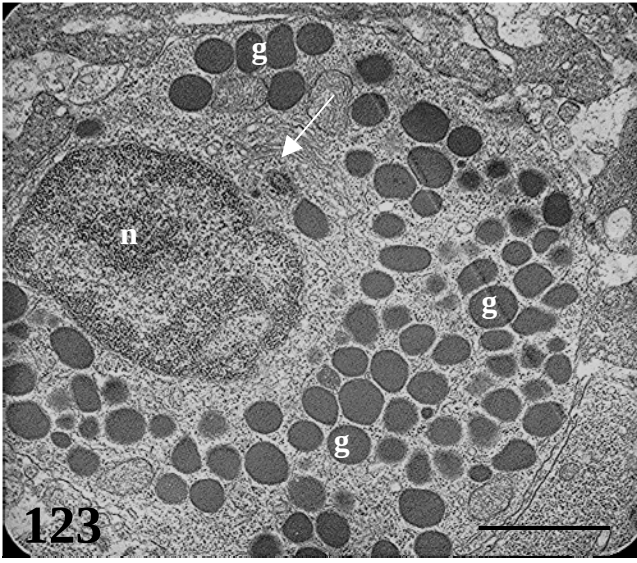
Fig. 124. Cripta al període de post-posta on quasi només hi trobem material amorf. cc: cèl·lula criptal; d: desmosoma; ma: material amorf. Barra= 5 µm.

Fig. 125. Algunes de les unions entre les cèl·lules criptals es trenquen durant l'època de post-posta. cc: cèl·lula criptal; →: desmosoma en trencament. Barra= 2 µm.

Fig. 126. Imatge al microscopi òptic de l'experiment amb el traçador HRP. Noti's que no es detecta el marcador a la imatge. HRP. Barra= 50 µm.

Figs. 127 i 128. Electromicrografies de l'experiment amb HRP on podria intuir-se fins on pot avançar el traçador. cc: cèl·lules criptals; sz: espermatozoides; →: punt on sembla que el traçador ja no avança. Barres= 10 µm i 5 µm.

Làmina XXVI: Canvis histològics de les criptes:



3.2.2 Discussió:

L'ovari d'*H. d. dactylopterus* s'estructura en un parènquima que es desenvolupa radialment entorn el sistema circulatori sanguini, tot travessant centralment la gònada. Aquesta estructura ovàrica és molt peculiar i només ha estat descrita en altres membres de la família Scorpaenidae (Koya i Muñoz, 2007) i en una altra família d'escorpeniformes, els Caracanthidae (Cole, 2003). Tal i com es comentarà a la discussió final d'aquest treball, es tracta d'un tipus d'organització gonadal que facilita la posta dels ous - o bé dels embrions - inclosos dins d'una massa gelatinosa, fet que pot suposar diferents tipus d'avantatges.

S'han descrit tres patrons principals de desenvolupament ovàric en els teleostis (de Vlaming, 1974, Blazer, 2002): sincrònic, grup-sincrònic i assincrònic. El patró de desenvolupament que segueixen els oòcits en l'ovari del penegal correspon al tipus assincrònic (Wallace i Selman, 1981): oòcits de tots els estadis de desenvolupament estan presents a l'ovari i la distribució de mida-freqüència dels oòcits és contínua. Aquesta organització, juntament amb la presència de fol·licles postovulatoris en ovaris que encara contenen oòcits previtel·logènics, indica que es realitza més d'una posta dins un mateix cicle reproductor.

Els canvis macroscòpics i histològics de les gònades, així com les variacions en pes i mida dels ovaris al llarg de l'any posen de manifest les etapes del cicle reproductiu de l'espècie.

A partir del mes d'abril, dins dels ovaris es va desenvolupant un nou cicle d'oòcits que aniran madurant al mateix temps que s'inicia l'emmagatzematge dels primers espermatozoides, però aquests processos no es comencen a traduir en un augment significatiu del valor de l'índex gonadosomàtic (IGS) fins al mes de setembre, moment en què apareixen els primers oòcits vitel·logènics. En aquest moment els ovaris són molt més voluminosos, presenten un aspecte gelatinós, amb una secció més aviat circular i un color groguenc degut a

l'acumulació de vitel en els oòcits madurs. Alhora, contenen moltes criptes plenes d'espermatozoides. Durant els mesos centrals de l'any les femelles presenten una bona condició física, la qual no disminueix fins la tardor, moment en què la vitel·logènesi i maduració dels oòcits implica un desgast energètic important.

A finals de desembre els ovaris de les femelles recol·lectades contenen grans quantitats d'oòcits madurs, els quals comporten un increment continuat de l'índex gonadal fins a un pic màxim al mes de març, degut a l'augment del volum de les cèl·lules sexuals i a l'acumulació de gran quantitat de material gelatinós que representa el fluid ovàric.

Després del valor màxim al mes de març, l'IGS decreix dràsticament a causa del fenomen de la posta, que té lloc en aquesta època i que deixa els ovaris pràcticament buits, d'un color rosat fosc, i amb unes parets més gruixudes i dures, a resultes de la disminució del volum ovàric.

L'evolució de l'índex hepatosomàtic (IHS) mostra les variacions al llarg de l'any del pes relatiu del fetge, variacions que reflecteixen el procés d'emmagatzematge i transferència de proteïnes i lípids associats a la reproducció. Quan la dieta materna és deficient, la transferència insuficient de lípids cap als ovaris en desenvolupament probablement reduirà la fecunditat i la viabilitat de la progènia (Watanabe, 1985; Luquet i Watanabe, 1986; Heming i Buddington, 1988), de manera que és imprescindible que les femelles disposin d'una bona reserva lipídica, sobretot en els mesos finals del cicle reproductiu.

Els resultats obtinguts en aquest treball mostren que, després de l'època de posta, comença a incrementar l'IHS a partir del mes d'abril, moment que coincideix plenament amb el final de la posta per una banda i amb el període de màxim creixement somàtic del penegal (Isidro, 1987; Esteves *et al.*, 1997; White *et al.*, 1998; Massutí *et al.*, 2000b), de manera que són resultats que podrien resultar desconcertants. Una explicació és que al mes d'abril el desgast que implica la maduració final dels ous i embrions ja està feta, permetent doncs que la femella es recuperi i emmagatzemi de nou més reserves hepàtiques per poder després encarar les primeres fases del desenvolupament d'un nou cicle d'oòcits; malgrat que es tractaria d'una recuperació extremadament ràpida. A

més, en aquest sentit, cal dir que els valors de l'IHS del nostre estudi coincideixen bastant acuradament amb els obtinguts per Muñoz *et al.* (1999), ja que en els dos casos es van acumulant reserves hepàtiques des de mitjans d'any fins arribar a un pic important a la tardor. Cap al final de l'hivern els valors de l'índex hepatosomàtic van davallant a causa de l'enorme desgast energètic que implica la preparació de la posta, que s'esdevé els primers mesos de l'any. Pel que fa al factor de condició (Kn), índex que reflexa l'estat físic dels exemplars, no presenta variacions acusades al llarg de l'any, excepte en els mesos de setembre i octubre. La caiguda del factor Kn en aquests mesos molt probablement es deu a l'inici de la vitel·logènesi i la maduració final dels oòcits, procés que suposa un enorme despesa energètica per les femelles.

Les criptes intraovàriques que emmagatzemen espermatozoides representen probablement la principal peculiaritat de la biologia reproductiva del penegal. En primer lloc, cal considerar les causes que poden explicar la diferenciació citològica de cèl·lules epitelials per tal de formar aquestes criptes, donat que la majoria d'espècies de teleostis que emmagatzemen espermatozoides no tenen cap mena d'estructura especialitzada en aquesta funció. Creiem que, en el cas que ens ocupa, l'existència de les estructures criptals pot explicar-se pel llarg període de temps en el que els espermatozoides romanen dins l'ovari de la femella, ja que la resta d'espècies que emmagatzemen esperma ho solen fer per períodes més curts de temps. Aquest és el cas, per exemple, de *Sebastes schlegeli* (Mori *et al.*, 2003), *Alcichthys alcicornis* (Koya *et al.*, 1997) o *Cymatogaster aggregata* (Gardiner, 1978), espècies que no presenten cap mena d'estructura diferenciada.

Un primer aspecte que ens interessava és el procés de formació d'aquestes estructures d'emmagatzematge. L'augment constatat en el número de criptes existents en l'ovari a mesura que avança el cicle reproductiu, indica que aquestes es formen de nou per a cada cicle. La similitud en la morfologia cel·lular de les cèl·lules epitelials lamel·lars i les cèl·lules epitelials criptals,

suggereix clarament que la cripta es forma a partir d'una especialització de l'epiteli que recobreix les lamel·les.

Així doncs, es va procedir a investigar aquest assumpte utilitzant l'antígen nuclear de proliferació nuclear (PCNA), proteïna nuclear no histònica altament conservada que s'expressa en el nucli, i que té la seva màxima expressió en les fases S (síntesis o replicació de l'ADN) i G2 (creixement) del cicle cel·lular (Hall *et al.*, 1990). D'aquesta manera la tècnica de la PCNA permet detectar cèl·lules en totes les fases actives del cicle cel·lular (Foley *et al.*, 1991). L'objectiu era corroborar la hipòtesi que els grups d'espermatozoides eren englobats per l'epiteli lamel·lar en entrar en contacte amb determinades zones d'aquest epiteli, donant lloc així al naixement d'una cripta. Efectivament, les cèl·lules en contacte amb la cavitat ovàrica foren les que es marcaren amb l'antígen. Es van utilitzar mostres obtingudes en diferents mesos per tal d'analitzar els diferents estadis del cicle ovàric, i així s'observà que la proliferació de les cèl·lules del voltant de les criptes és major en els mesos d'estiu. Per tant, la formació d'aquestes estructures comença a partir d'aquest moment i es perllonga durant tot el període d'emmagatzematge, ja que es van donant més còpules i, per tant, més entrada d'esperma. A finals d'any la immensa majoria de criptes ja estan plenes d'espermatozoides a punt per ser alliberats i procedir a la fertilització.

És evident que un període d'emmagatzematge tan llarg requereix solventar un seguit d'aspectes importants com els relacionats amb la defensa dels espermatozoides envers el sistema immunitari de la pròpia femella, i els relacionats amb la nutrició de les cèl·lules sexuals masculines per tal d'assegurar la seva viabilitat fins al moment de la fertilització.

Respecte als mecanismes de protecció, l'enorme quantitat d'unions fortes i desmosomes que existeix entre les cèl·lules criptals probablement estableix una eficient barrera entorn la cripta, protegint així els espermatozoides continguts en el seu interior. Aquest tret implica una compartimentalització de la cavitat ovàrica, de manera que a més de permetre l'existència d'un microambient favorable al manteniment dels espermatozoides, també es

protegeix l'esperma enfront el propi sistema immunitari de la femella, el qual podria detectar les cèl·lules sexuals masculines com a cèl·lules alienes al seu cos i destruir-les.

Al final del període de posta, s'observen processos degeneratius dins l'ovari de l'espècie en estudi, inclosa l'eliminació dels espermatozoides residuals. Aquests presenten una cromatina descondensada i granulada amb una menor densitat electrònica. Més endavant el nucli dels espermatozoides en degradació esdevé un cos dens multilamel·lat i diversos tipus de cèl·lules del sistema immune s'infilten cap a dins les criptes per tal de fagocitar aquestes restes espermàtiques. Canvis degeneratius similars foren descrits per Koya *et al.* (1997) en l'espècie *Alcichthys alcicornis*. En aquest sentit, la menor compactació i la disminució en el nombre i/o fermesa de les unions intercel·lulars detectades en els mesos posteriors a la posta probablement faciliten el pas de les cèl·lules fagocitàries observades cap a dins les criptes per tal d'eliminar els espermatozoides que no s'han utilitzat en la fertilització, tal i com assenyalen els materials multilamel·lats membranosos que contenen al seu interior i que semblen provenir d'espermatozoides degenerats.

Malgrat haver corroborat l'existència d'aquestes unions entre les cèl·lules criptals sota el microscopi electrònic, vàrem voler també demostrar la seva funció protectora mitjançant múltiples rèpliques de l'experiment amb Horseradish Peroxidase (HRP). Aquest traçador s'ha utilitzat en altres treballs que també analitzen les unions intercel·lulars, concretament en espècies vivíparas com *Cymatogaster aggregata* (Gardiner, 1978) o *Xiphophorus maculatus* (Potter i Kramer, 2000), així com en teleostis ovípars com *Alcichthys alcicornis* (Koya *et al.*, op.cit.), *Fundulus heteroclitus* (Brummett *et al.*, 1982) i *Syngnathus scovelli* (Begovac i Wallace, 1987). El traç d'HRP detectat a les cèl·lules criptals recolza la hipòtesi que les seves unions desmosòmiques desenvolupen la funció de barrera, malgrat que els resultats no foren tot lo explícits que ens hauria agradat. Durant l'estació reproductiva el traçador no penetra dins l'estructura d'emmagatzematge degut a l'existència de fortes unions entre les cèl·lules que la delimiten, conferint un aïllament particular a les cèl·lules espermàtiques emmagatzemades fins el període de posta. Després de

la posta, i a causa del trencament de les unions intercel·lulars, el traçador ha de poder penetrar a la cavitat ovàrica.

Pel que fa a la nutrició dels espermatozoides emmagatzemats, els vasos sanguinis localitzats prop de les criptes poden estar relacionats amb la distribució de diverses substàncies per part de la femella. Durant tot el període d'emmagatzematge les cèl·lules epitelials criptals mostren una considerable activitat secretora. Les vesícules secretores romanen prop de la membrana plasmàtica de les cèl·lules fins al moment en el qual una senyal extracel·lular provoca l'alliberament del seu contingut (Alberts *et al.*, 1996). Les observacions fetes al microscopi electrònic de transmissió ens permeteren veure alguns grànuls de secreció provinents de l'epiteli criptal i localitzats ja a l'interior d'algunes criptes. La textura granular del material contingut en aquests grànuls ens fa pensar que molt probablement es tracti de material de naturalesa mucopolisacàrida, tal i com suggereixen les tincions histoquímiques realitzades prèviament per l'estudi al microscopi òptic per Muñoz *et al.* (2002b). Els grànuls de secreció observats al microscopi electrònic foren detectats durant tot el període d'emmagatzematge. A més, la presència d'importants quantitats de reticle endoplasmàtic rugós, un aparell de Golgi ben desenvolupat, vesícules de secreció i ribosomes lliures al citoplasma de les cèl·lules criptals, són també clares evidències de síntesi proteica, de manera que els grànuls podrien també contenir petites quantitats de pèptids al seu interior. De fet, en aquest sentit, anteriorment ja s'ha comentat que l'epiteli criptal molt probablement deriva de l'epiteli lamel·lar, pel qual s'ha documentat la secreció de substàncies en almenys tres altres espècies d'escorpeniformes: *Hexagrammos octogrammus* (Koya *et al.*, 1993a), *Sebastolobus macrochir* (Koya i Matsubara, 1995) i *Alcichthys alcicornis* (Koya *et al.*, 1995a).

Per altra banda, en aquest treball s'ha observat un tret destacable de la morfologia espermàtica no descrit prèviament en cap altra espècie: la bossa citoplasmàtica dels espermatozoides madurs emmagatzemats dins els ovaris. El fet que la quantitat total de citoplasma decreixi a mesura que s'apropa

l'època de posta en la gran majoria de casos suggereix que la funció d'aquesta bossa està també relacionada amb la nutrició i, per tant, amb el manteniment de la viabilitat dels espermatozoides al llarg del període d'emmagatzematge. Un altre fet que recolza aquesta hipòtesi és la situació que mostra la imatge 117, en la que criptes veïnes presenten cèl·lules sexuals masculines amb quantitats molt diferents de material de reserva. Aquesta imatge correspon al mes de gener, així que, tenint en compte que en aquestes dates els mascles encara poden realitzar les últimes inseminacions, creiem que els espermatozoides amb gran quantitat de material de reserva fa relativament poc que han entrat dins l'ovari, i per tant no han consumit les reserves citoplasmàtiques pertinents, mentre que els altres pràcticament les han esgotat després d'un llarg període d'emmagatzematge. D'aquesta manera s'assegura que aquests arribin finalment al moment en el que la femella ha madurat els seus ous i poder així procedir a la fertilització. La tinció de talls histològics dels ovaris amb lectines ens permet corroborar l'existència de components glucídics a l'interior de les bosses citoplasmàtiques dels espermatozoides continguts dins les criptes. Aquest component podria tenir un paper clau en el manteniment de les cèl·lules sexuals masculines durant el llarg emmagatzematge intraovàric, constituint una font nutritiva vital per garantir la seva viabilitat.

En els espermatozoides emmagatzemats dins les criptes ovàriques, aquesta bossa de citoplasma no els confereix una morfologia massa hidrodinàmica, però cal tenir en compte que durant el període d'emmagatzematge no els cal moure's. Cal recordar que hem detectat que, en el moment de la fertilització, els gàmetes masculins ja pràcticament no presenten restes de citoplasma entorn els seus caps, adoptant així una morfologia més hidrodinàmica que els permet nedar, entrar a través del micròpil de l'ou i fecundar-lo. A més, les expansions laterals del seu flagel probablement ajuden en la propulsió.

Així doncs, per una banda l'esperma emmagatzemat es manté en un microambient protegit del sistema immune de la femella a través d'un gran nombre d'unions intercel·lulars entre les cèl·lules que delimiten la cripta. I per altra banda, creiem que la seva nutrició es dona per dues possibles vies: a

través de les pròpies reserves energètiques que els espermatozoides tenen dins les bosses citoplasmàtiques del cap i part de la peça mitja, i mitjançant secrecions nutritives per part de l'epiteli criptal que emmagatzema les cèl·lules sexuals masculines.

3.3. FERTILITZACIÓ, DESENVOLUPAMENT EMBRIONARI I POSTA:

3.3.1. Resultats:

La gran majoria de femelles capturades al llarg de l'any, a excepció del mes de març, tenen fluid dins els ovaris. Aquest apareix en quantitats variables, depenent de la fase reproductiva en què es troba la femella.

Al llarg del període d'emmagatzematge d'esperma i durant el període de posta es dona una secreció de polisacàrids per part de l'epiteli intern de la paret ovàrica, els quals formen part del citat fluid ovàric. Aquesta secreció s'intensifica especialment en el període final d'aquest procés. En aquest sentit cal destacar que el fluid ovàric del penegal reacciona negativament a la tinció amb eosina durant la major part del cicle anual. Ara bé, a la fase final del període d'emmagatzematge i durant la posta el pH del fluid ovàric esdevé més bàsic i es tenyeix amb l'esmentat colorant.

És justament en l'època de posta quan el fluid gonadal esdevé també molt més abundant, ocupant tant l'entorn com l'interior dels ovaris. Aquesta substància gelatinosa és de consistència similar a l'albúmina o la clara d'ou, de manera que immediatament després de la dissecció de l'espècimen, és relativament fàcil recollir-la o observar-la al microscopi òptic (Figs. 129 i 130). D'aquesta manera es detectà que aquest fluid mucós conté tant ous fertilitzats en estadis inicials de desenvolupament embrionari com també oòcits de mida molt més reduïda (Fig. 131).

Les mostres de fluid recollides que foren fixades en formol just després de la dissecció de la femella presenten severes mostres de retracció. Per tant, la seva observació no permet fer una descripció dels estadis embrionaris existents. La deformació de l'ou provoca que les diferents parts d'aquest canviïn de posició. Només quan els embrions ja consten d'un nombre considerable de cèl·lules sembla que la seva morfologia general es manté força intacta ara bé, si estan en els primers estadis de desenvolupament embrionari la seva forma varia considerablement i és molt complicat, quasi impossible, identificar-los (Fig. 132). En algunes mostres els resultats no foren tan negatius i els embrions es presentaven pràcticament intactes, això sí, la membrana externa de l'ou estava totalment trencada (Fig. 133).

Per tal de reduir l'efecte negatiu del formol, una part dels ovaris fou preservada en una mescla de paraformaldehid al 4% i tampó PBS (Phosphate Buffer Saline, pH=7,2) per així determinar si aquesta seria la tècnica idònia per conservar els embrions intactes. Tanmateix, les observacions revelaren que aquest protocol també produeix certa retracció dels ous, sobretot del corion.

Pel que fa a les mostres de fluid que foren congelades directament a -20°C , quan es procedí a observar-les després de descongelar-les s'observà que, malgrat que la morfologia externa dels ous estava pràcticament intacta, el seu contingut intern era nul en la immensa majoria de casos. Els ous conservaven la seva forma ovalada però apareixien buits, excepte per la presència de la gota lipídica o bé una massa amorfa en el seu interior (Fig. 134). Amb els filtres de la tècnica microscòpica de Normansky (Fig. 135) poden distingir-se les cèl·lules embrionàries allà mateix on apareix la massa amorfa amb la tècnica microscòpica habitual. Aquesta coincidència suggereix que la massa de color marronós correspon al contingut de les cèl·lules que formaven part de l'embrió i que no han resistit el procés de congelació-descongelació i han rebentat.

Degut a que ni el formol ni la congelació resultaren ser procediments adequats, es prosseguí a obtenir mostres fresques i analitzar-les directament sota el microscopi òptic sense sotmetre-les a cap mena de tractament. Només en les mostres fresques de fluid els ous conserven la seva forma arrodonida i les estructures com el blastodisc, la gota lipídica o la bossa de vitel es mantenen en el seu lloc habitual.

En els ous no fertilitzats els alvèols corticals estan uniformement distribuïts pels voltants del vitel prop del corion. Aquests ous, que corresponen a l'estadi 1 de la classificació de Yamada i Kusakari (1991), també presenten nombroses gotetes lipídiques de varies mides escampades entre el vitel (Fig. 136). L'embolcall de l'ou és molt prim i, després de la fertilització, forma un estret espai perivitel·lí i desapareixen els grànuls corticals. Ara bé, cal esmentar que l'estret espai perivitel·lí de l'ou no és fàcil d'observar sota el microscopi òptic en mostres fresques no sotmeses a cap tipus de tinció (veure figura 137). Inicialment els ous fertilitzats tenen forma esfèrica i presenten una sola gota lipídica d'un fort color taronja-marronós. *H. dactylopterus* és una espècie

lecitotròfica de manera que, sempre associada al grup de cèl·lules en divisió o embrió, trobem una bossa translúcida de vitel (Fig. 138), que servirà per nodrir l'embrió durant el seu desenvolupament. A l'interior d'aquesta bossa hi trobem el vitel, de consistència granular.

Les tincions que utilitzen un colorant amb afinitat pel nucli permeten determinar, mitjançant microscopia de fluorescència on està situat l'embrió dins de cada ou (Figs. 139a, 139b).

Gràcies a l'afinitat del colorant DAPI pel DNA s'aconsegueix identificar clarament els nuclis cel·lulars (veure Figs. 146a i b, 147a i b, 148a i b). D'aquesta manera es pot corroborar on es troben exactament les cèl·lules pròpiament pertanyents a l'embrió. Evidentment amb aquesta tècnica també es detecten els oòcits immadurs immersos en el fluid ovàric, juntament amb els embrions (Figs. 140a, 140b).

El colorant Hoescht, té una major permeabilitat i ens permet tenyir i diferenciar els nuclis de les cèl·lules embrionàries en algunes mostres que no aconseguíem tenyir correctament amb DAPI (Fig. 141).

A mesura que l'embrió madura la morfologia de l'ou varia lleugerament, esdevenint més allargat i més gran i, per tant, mostrant un axis una mica més llarg que l'altre. Així, el diàmetre mig dels ous fecundats és d'uns $746,8 \pm 43,40 \mu\text{m}$; la longitud mitjana uns $864,16 \pm 60,03 \mu\text{m}$; i l'amplada mitjana $691,8 \pm 52,38 \mu\text{m}$. Per tant, s'observa un canvi en la forma de l'ou, passant de ser relativament esfèric a més el·líptic (veure Fig. 142).

✓ 3.3.1.1 Estadis de desenvolupament embrionari:

La descripció dels estadis de desenvolupament embrionari ha estat basada en el treball de Yamada i Kusakari (1991), el qual es recolza en treballs com els d'Oppenheimer (1937) o Boehlert i Yoklavich (1984).

Amb l'ovulació, i amb la subsegüent fertilització, el vitel esdevé clar i translúcid i es destaca la gran gota lipídica. En els dies que segueixen aquest procés es desenvolupen els primers estadis del desenvolupament embrionari.

Cal destacar que els ovaris que contenen més quantitat de fluid coincideixen amb els que contenen els embrions en estadis més avançats de desenvolupament, fins a l'estadi de blàstula (estadi 10) o en estadis primerencs de discoblàstula. En els casos en els que el fluid és escàs, bé sigui perquè la femella es troba al principi del període d'acumulació de fluid o bé perquè ja ha realitzat alguna primera posta, només apareixen embrions en les fases més primerenques de desenvolupament, és a dir, embrions en estadi de segmentació, que corresponen als estadis 2-8 descrits per Yamada i Kusakari (1991). En aquestes primeres fases de la segmentació els blastòmers (cèl·lules de segmentació) tendeixen a adquirir una forma esfèrica. A mesura que es van dividint, la pressió que exerceixen uns blastòmers contra els altres sol aplanar les superfícies de contacte, però les superfícies lliures es mantenen esfèriques. En aquesta fase l'embrió adquireix un aspecte característic similar al d'una mora. Degut a aquesta semblança l'embrió en aquesta fase s'anomena mòrula (estadi 9).

Quan s'analitza el fluid ovàric sota el microscopi es detecten molts embrions en l'estadi de segmentació primerenca, on s'observa un grup de cèl·lules clarament definides situades al pol animal de l'ou i amb una gota lipídica situada al pol vegetal (Fig. 143), a vegades dividida (Fig. 144). En alguns casos el pol animal conté unes poques cèl·lules grans i en d'altres, ja una mica més avançats en el seu desenvolupament, apareixen moltes més cèl·lules i de mida molt més reduïda (Fig. 145).

Mitjançant les citades tincions amb colorants nuclears es van observar blàstules en diferents estadis de desenvolupament: unes presentaven uns pocs blastòmers molt grans (Figs. 146a, 146b), o l'estadi immediatament consecutiu a aquest (Figs. 147a, 147b) que correspondria a l'estadi 7 de Yamada i Kusakari (1991). En altres casos els embrions ja estaven formats per una gran quantitat de petites cèl·lules degut a l'avanç de la divisió cel·lular (Figs. 148a, 148b), embrions que estarien en l'estadi 8, en el qual es prioritza la multiplicació cel·lular més que el creixement de l'embrió.

Fins a la fase de blàstula (estadi 10) el vitel continua prop del pol vegetatiu de la cèl·lula.

Malgrat que en els ovaris amb una quantitat de fluid ovàric important també hi ha embrions en estadi de segmentació, són molt més abundants els que es troben en estadi de blàstula: estadi en el que la divisió cel·lular ja dóna lloc a una massa de cèl·lules més ben definida tal i com es pot apreciar a la Fig. 149, que correspondria a l'estadi 10-11 de la citada classificació, en el qual el blastodisc té una aparença aplanada. Alguns eren blàstules molt inicials (estadi 10) i d'altres ja es veien molt ben delimitades (Fig. 150). Aquestes últimes corresponen a l'estadi 11, en el que el blastodisc té una forma biconvexa. Donat que la segmentació està restringida al casquet del citoplasma situat al pol animal, el blastoderm adquireix forma d'un disc situat a aquesta regió polar, rebent el nom de blastodisc i esdevenint més o menys convex.

En aquells ovaris en què la quantitat de fluid és enorme, existeixen uns pocs embrions en estadi de segmentació (estadis 2-8), uns quants en estadi de blàstula (estadis 10-11) i la immensa majoria es troben en estadi de discoblàstula més o menys avançada. En aquest estadi les cèl·lules embrionàries formen un disc aplanat al pol animal de l'ou i el blastocèle es veu semitransparent si observem l'ou per una banda. Aquests factors coincideixen amb l'estadi 12 de la classificació de Yamada i Kusakari (1991). La disposició dels blastòmers en aquesta fase és molt variable en funció del grup animal que considerem. Normalment a mesura que l'ou es segmenta els blastòmers es disposen en una capa, formant part de la superfície externa de l'embrió. Llavors apareix una cavitat que anirà creixent i que s'anomena blastocèle. De la mateixa manera, la capa epitelial formada pels blastòmers s'anomena blastoderm. En els ous de la immensa majoria de peixos ossis, les cèl·lules superficials estan unides amb més fermesa que no les més internes, que tenen connexions més laxes fins més endavant. No obstant l'epiteli no pot tenir forma esfèrica. Esporàdicament es detecten embrions en estadis una mica més avançats, en els que es pot intuir la zona caudal i la zona cefàlica de l'embrió (Figs. 151 i 152). La figura 151 correspondria a l'estadi 18, estadi en el que l'embrió cobreix quasi tres quartes parts de la superfície del vitel i es distingeix perfectament l'axis embrionari. En la figura 152 ja estaríem a l'estadi 19. En

aquest estadi existeix una condensació de cèl·lules entorn l'axis embrionari allà on hi haurà els futurs somites.

Al final d'aquesta fase de creixement embrionari s'evidencien clarament diferents somites al llarg del tronc de l'embrió.

Excepcionalment - i en una mostra atlàntica - s'ha observat un estadi encara més avançat de desenvolupament, en el que es distingeixen les càpsules òptiques a banda i banda de la zona del cap (Figs. 153, 154 i 155). A més, amb l'objectiu de 40X del microscopi òptic, mitjançant el moviment del micromètric, es detecten clarament fins a 16 somites a la zona central de l'eix de l'embrió. Aquest embrió es trobaria aproximadament en la fase 20. En aquest moment es distingeixen clarament les càpsules òptiques i existeixen les primeres contraccions cardíques que a mesura que va creixent el cor derivaran en una conducció de pulsacions regulars.

Làmina XXVII: Obtenció de fluid i protocols:

Fig. 129. Recol·lecció del fluid ovàric immediatament després d'extreure els ovaris del cos de la femella.

Fig. 130. Portaobjectes amb una mostra de fluid ovàric preparada per ser observada al microscopi òptic.

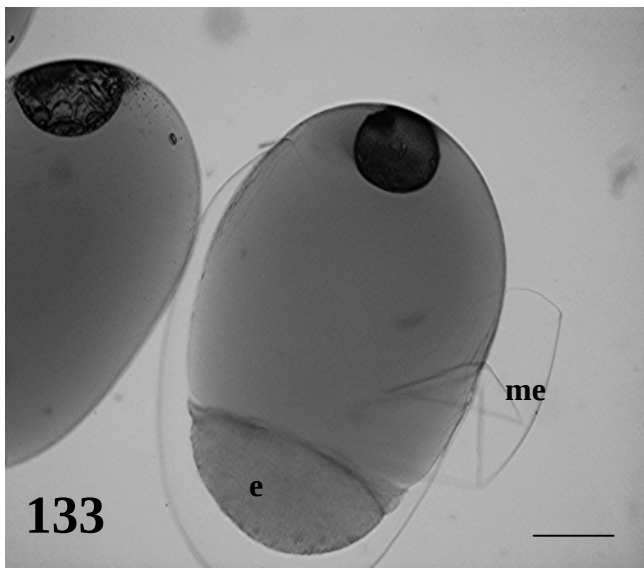
Fig. 131. Imatge d'una mostra de fluid al microscopi òptic on es poden observar en un mateix camp visual embrions en estadis primerencs de desenvolupament i un oòcit no fecundat. e:embrió en desenvolupament; o:oòcit. Barra: 30 μm .

Fig. 132. Mostra de fluid ovàric fixada amb formol on s'observa l'evident retracció de l'ou, que perd totalment la seva forma esfèrica habitual. Barra: 30 μm .

Fig. 133. Mostra preservada en formol i observada sota el microscopi òptic en la qual els embrions van mantenir la seva estructura però la membrana externa de l'ou estava molt danyada. e:embrió en desenvolupament; me:membrana externa ou. Barra: 20 μm .

Fig. 134. En les mostres congelades directament a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ la morfologia externa de l'ou no variava però internament apareixien buits, excepte per la gota lipídica. gl:gota lipídica. Barra: 30 μm .

Làmina XXVII: Obtenció de fluid i protocols:



Làmina XXVIII: Obtenció de fluid i protocols:

Fig. 135. Observant les mostres congelades amb la tècnica de Normansky (DIC) es podien detectar les cèl·lules embrionàries que amb la microscopia òptica habitual no es distingien. Barra: 30 μm .

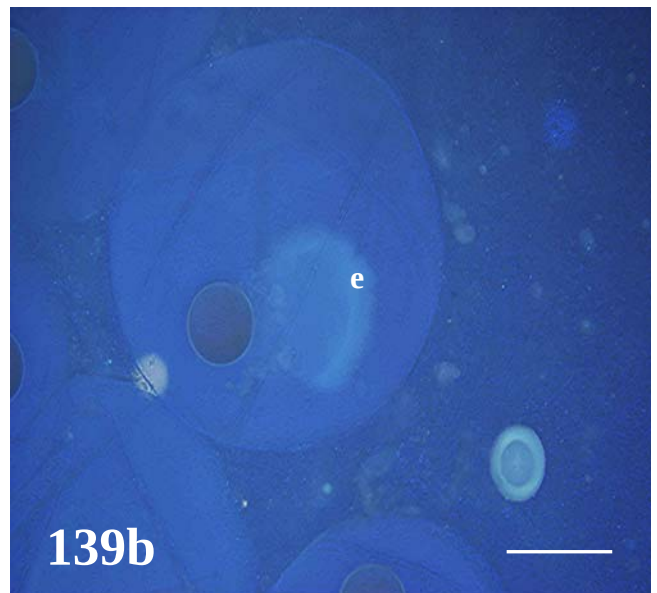
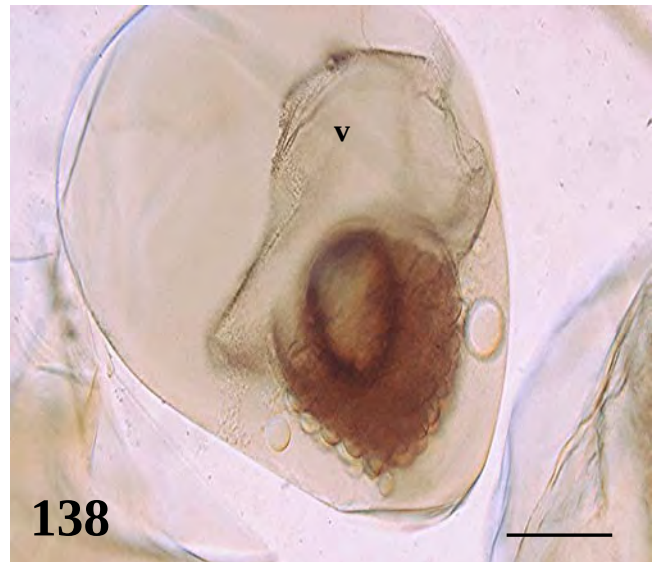
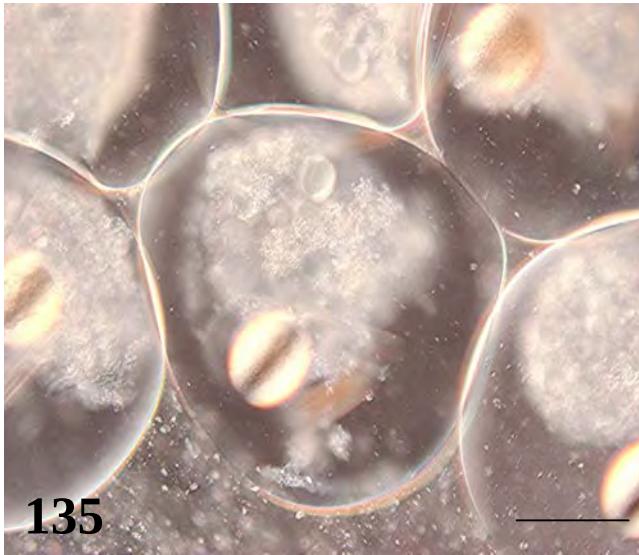
Fig. 136. Els ous no fertilitzats presenten moltes gotes lipídiques immerses entre les gotes de vitel. Barra: 10 μm .

Fig. 137. En els primers estadis de desenvolupament l'ou conserva la forma esfèrica i presenta una evident gota lipídica de color marronós. $\rightarrow$: espai perivitel·lí. Barra: 30 μm .

Fig. 138. Imatge al micròscopi òptic d'una mostra fixada en formol on es pot veure la bossa de vitel que sempre trobem associada a l'embrió en desenvolupament. v: vitel. Barra: 30 μm .

Figs. 139a, 139b. La tinció amb el colorant nuclear DAPI permet corroborar la situació exacta de l'embrió dins l'ou. e: embrió. Barra: 30 μm .

Làmina XXVIII: Obtenció de fluid i protocols:



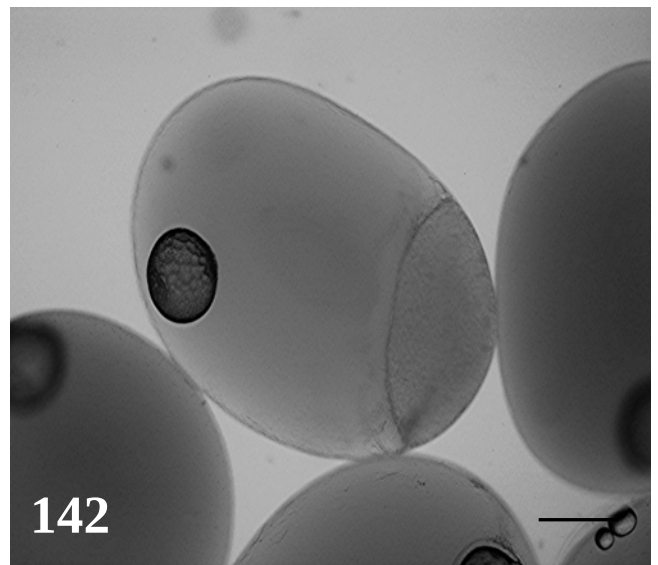
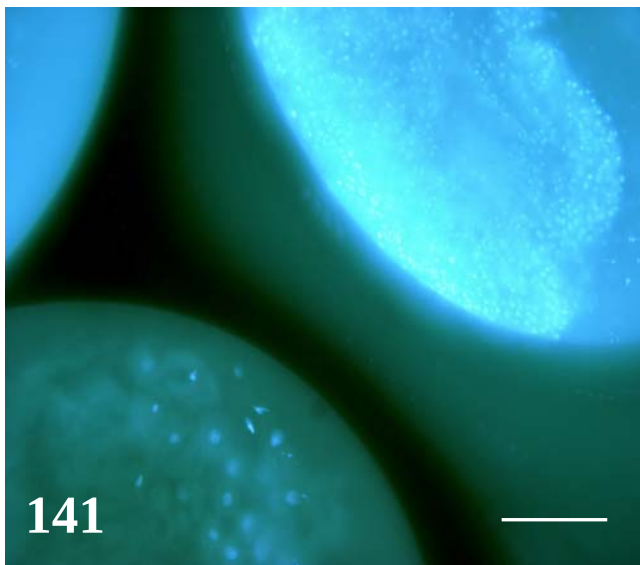
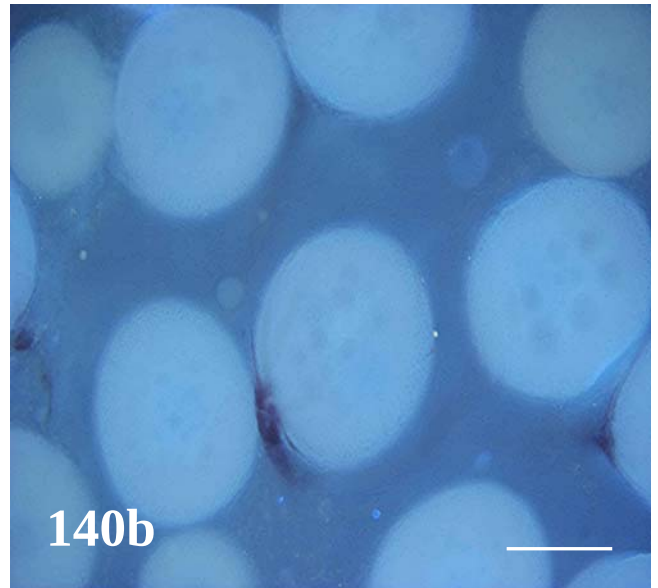
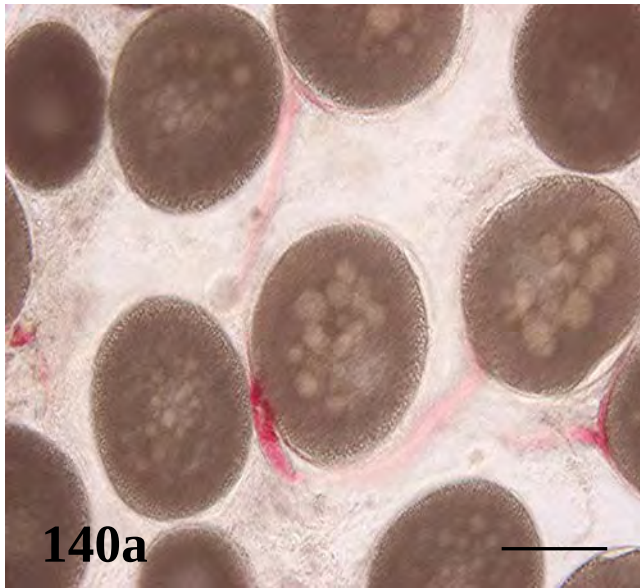
Làmina XXIX: Obtenció de fluid i protocols:

Figs. 140a, 140b. El colorant DAPI també tenyeix els ous no fecundats immersos en la matriu gelatinosa. Barra: 30 μm .

Fig. 141. Imatge d'una mostra tenyida amb el colorant Hoescht, colorant amb major permeabilitat que el DAPI. Barra: 15 μm .

Fig. 142. Com es pot observar a la fotografia, la forma de l'ou fertilitzat és ovalada o el·líptica. Barra: 20 μm .

Làmina XXIX: Obtenció de fluid i protocols:



Làmina XXX: Estadis embrionaris:

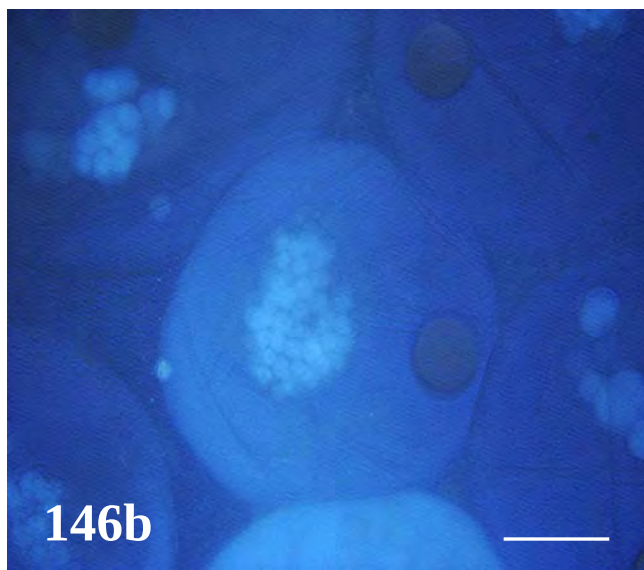
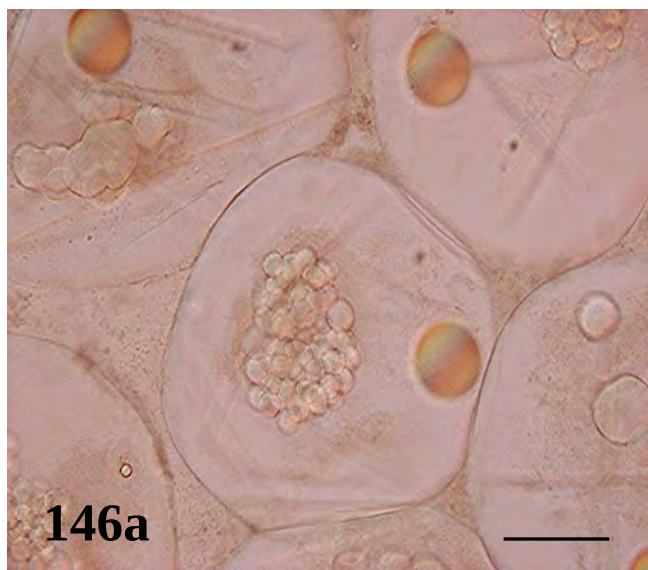
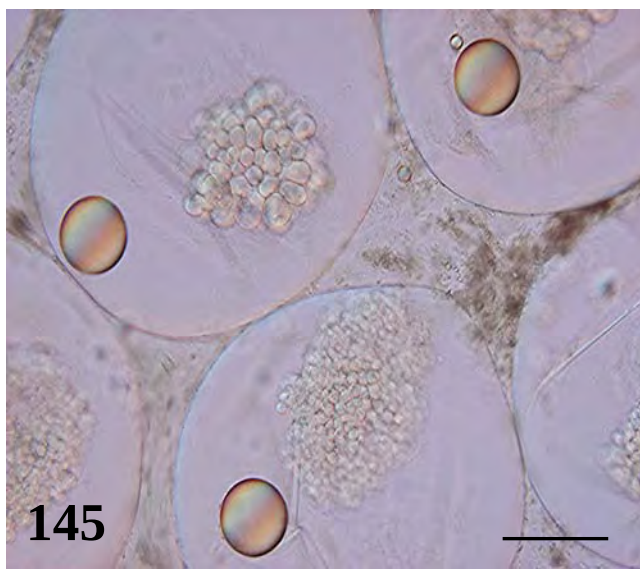
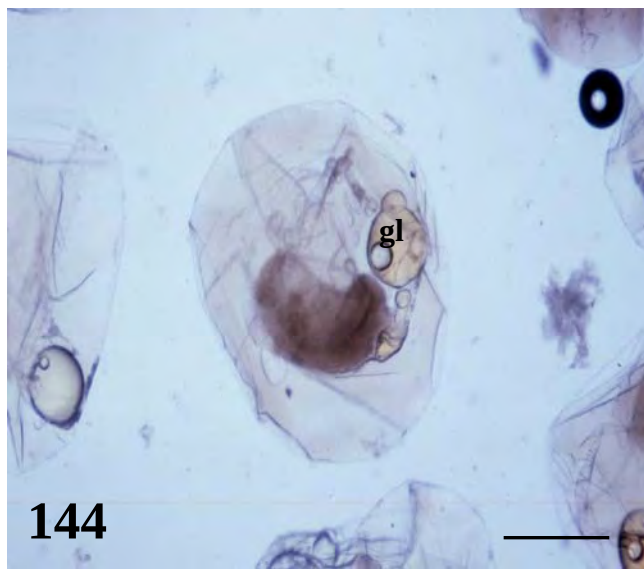
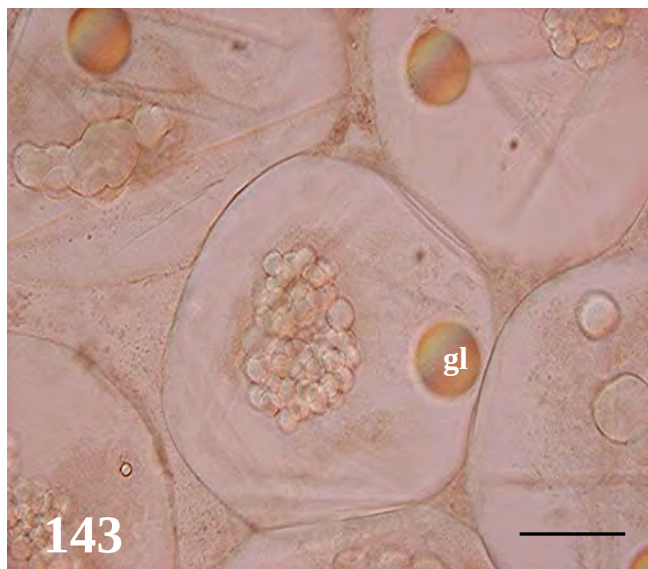
Fig. 143. Embrions en estadi de segmentació primerenca, amb una evident gota lipídica situada al pol vegetal de l'ou i l'embrió al pol animal. gl: gota lipídica. Barra: 30 μm .

Fig. 144. Imatge d'un ou a l'interior del qual s'observa un embrió i una gota lipídica subdividida. gl: gota lipídica. Formol. Barra: 30 μm .

Fig. 145. Imatge al microscopi òptic on s'observa que en una mateixa mostra de fluid ovàric hi podem trobar embrions en diferents estadis de desenvolupament. Barra: 30 μm .

Figs. 146a, 146b. Imatge d'un embrió en estadi de segmentació primerenca observat al microscopi òptic normal i amb fluorescència (estadi 7). Barra: 30 μm .

Làmina XXX: Estadis embrionaris:



Làmina XXXI: Estadis embrionaris:

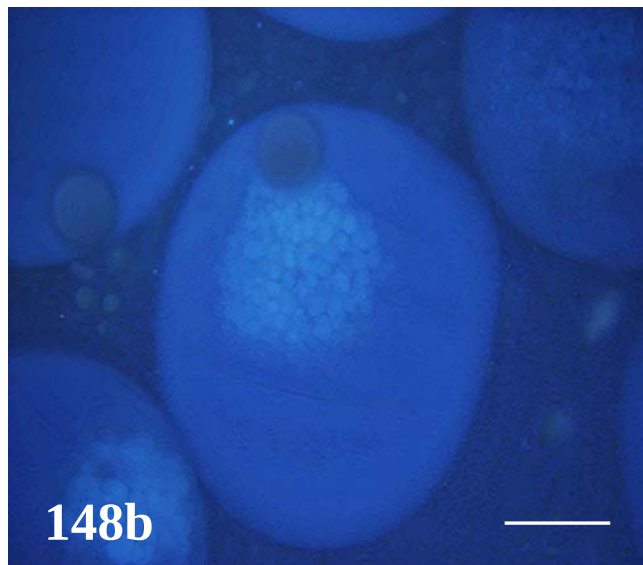
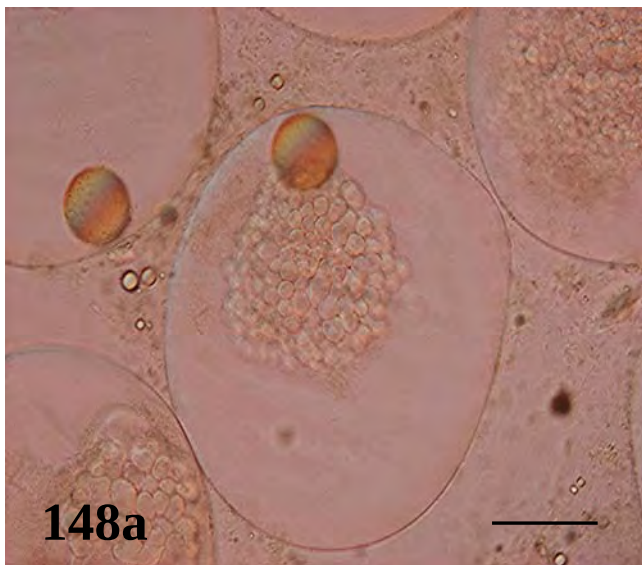
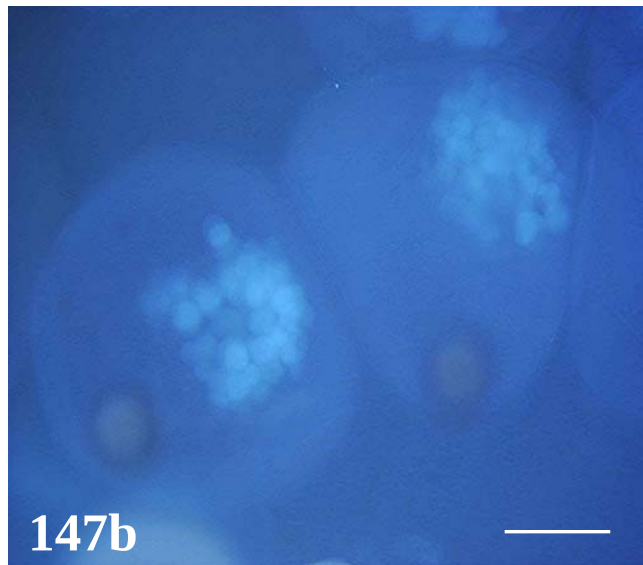
Figs. 147a, 147b. Imatge d'un embrió format per cèl·lules de menor mida que correspondria a l'estadi immediatament consecutiu al de la figura anterior. Primer fou observat al microscopi òptic normal i després amb fluorescència per determinar la posició exacta dels nuclis. Barra: 30 μm .

Figs. 148a, 148b. Amb l'avanç de la divisió cel·lular l'embrió cada cop està integrat per cèl·lules més petites. Estadi 8. Imatge al microscopi òptic normal i amb fluorescència. Barra: 30 μm .

Fig. 149. Blàstula amb forma aplanada corresponent a l'estadi 11 de la classificació de Yamada i Kusakari (1991). Barra: 30 μm .

Fig. 150. Discoblàstula, estadi 12. Barra: 30 μm .

Làmina XXXI: Estadis embrionaris:



Làmina XXXII: Estadis embrionaris:

Fig. 151. Estadi 18, estadi en el que l'embrió cobreix quasi tres quartes parts de la superfície del vitel i es distingeix perfectament l'axis embrionari. Barra: 30 μm .

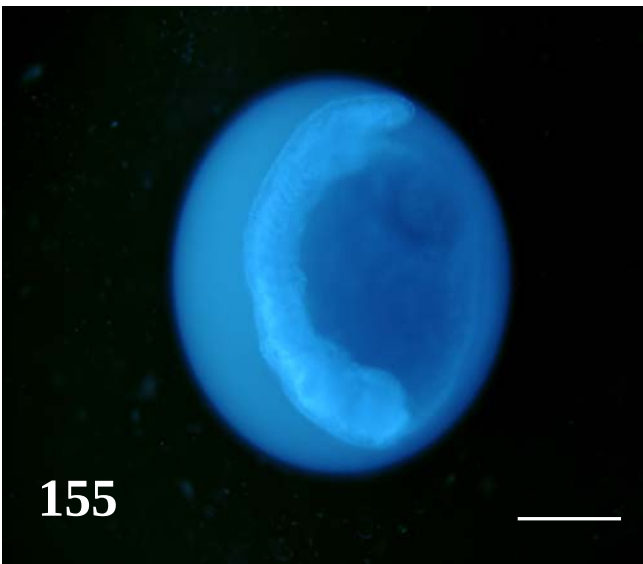
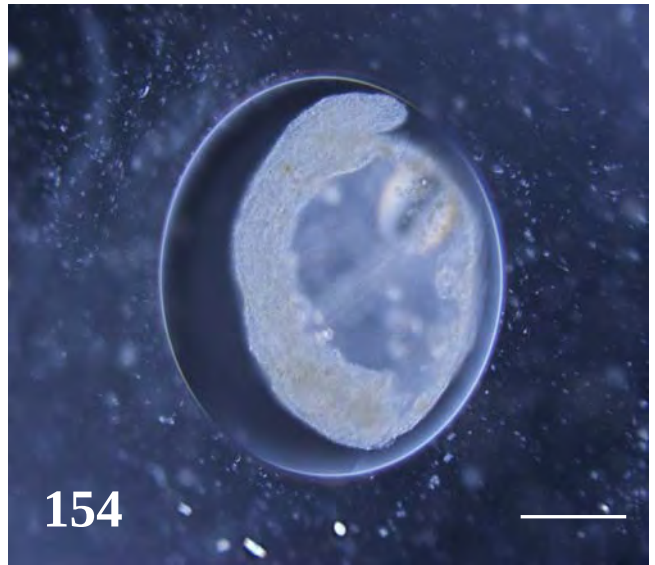
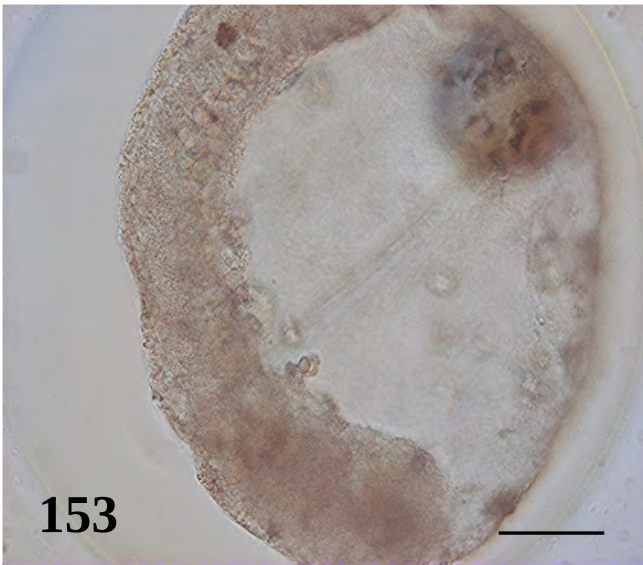
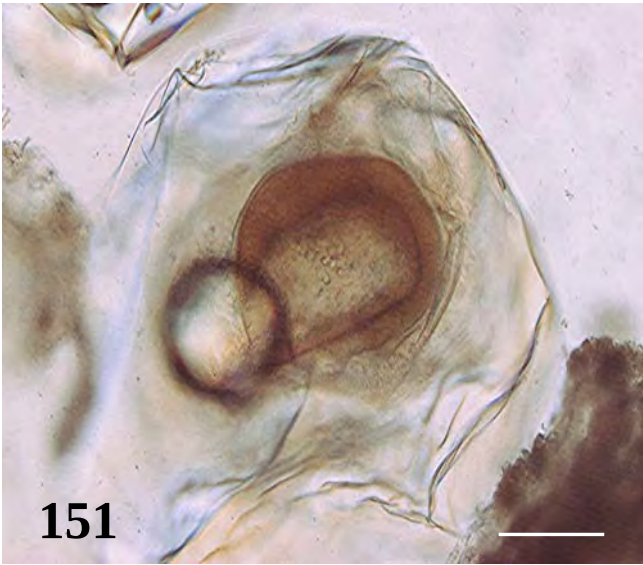
Fig. 152. Estadi 19. En aquest estadi existeix una condensació de cèl·lules entorn l'axis embrionari allà on hi haurà els futurs somites. Barra: 30 μm .

Fig. 153. Embrió en l'estadi de 16 somites. Aproximadament correspondria a la fase 20. Microscopi òptic. (Foto cedida per Vera Sequeira) Barra: 30 μm .

Fig. 154. Embrió en l'estadi de 16 somites. DIC. (Foto cedida per Vera Sequeira). Barra: 30 μm .

Fig. 155. Embrió en l'estadi de 16 somites. Hoescht. (Foto cedida per Vera Sequeira). Barra: 30 μm .

Làmina XXXII: Estadis embrionaris:



3.3.2 Discussió :

Helicolenus dactylopterus és una espècie que fertilitza internament els seus ous i els manté dins el cos de la femella durant un cert període de temps abans d'alliberar-los, en estadis primerencs de desenvolupament, al medi aquàtic.

El primer esdeveniment visible de la maduració final de l'oòcit és la migració de la vesícula germinal cap al pol animal. L'embolcall de la vesícula germinal es trenca i el contingut del nucli es barreja amb el citoplasma. És per aquesta raó que en les tincions amb els colorants nuclears els oòcits que es troben en aquests estadis apareixien totalment tenyits, ja que el material nuclear es troba dispers per tot el citoplasma de l'oòcit.

L'embolcall de l'ou és molt prim i després de la fertilització forma un estret espai perivitel·lí, també descrit en *Helicolenus dactylopterus lahillei* (Sánchez i Acha, 1988), *Sebastes schlegeli* (Yamada i Kusakari, 1991) i *S. oblongus* (Fujita, 1958).

A l'interior de l'ovari el corion és una estructura tova i comença a endurir-se després de l'ovulació. Poc després de la fertilització, el corion es separa completament de l'ooïema (superfície de l'oòcit), continua endurint-se i l'estret espai perivitel·lí s'evidencia clarament. Aquest últim està limitat pel corion, que funciona com una membrana semipermeable: és impermeable a la majoria de molècules grans i permeable a l'aigua, petits electrolits, sucres i colorants (Alderdice *et al.*, 1984). L'estretor de l'espai perivitel·lí dels ous pot representar una adaptació a la viviparitat en la qual un determinat nombre d'ous es desenvolupen sota protecció en un espai restringit.

El canvi de forma de l'ou, que passa de ser esfèric a lleugerament el·líptic, podria deure's al fet que l'embolcall de l'ou és menys rígid que en altres espècies, un fet ja descrit pels embrions de *Sebastes* (Fujita, 1958, 1959; Moser, 1967b). A les espècies ovíparas ovulíparas, el corion representa un 15-33% del pes sec de l'ou (Blaxter i Hempel, 1966; Robertson, 1974). No obstant, en *Sebastes melanops*, espècie vivípara, només representa un 1,6%. En aquest sentit, si comparem el gruix del corion dels oòcits madurs del penegal, 4 µm (Muñoz *et al.*, 2002b) amb el del corion d'un altre escorpènid ovípar amb

trets especialitzats com *Scorpaena notata*, 5,5 μm (Muñoz *et al.*, 2002d) o, encara més, amb el d'altres escorpeniformes clarament ovípars ovulípars com els tríglics *Aspitrigla obscura* (19 μm ; Muñoz *et al.*, 2001) i *Trigla lyra* (37 μm ; Muñoz *et al.*, 2002e), s'evidencia de forma clara el poc gruix d'aquesta capa en el cas de l'espècie que ens ocupa. A més, i relacionat amb aquest aspecte, també cal tenir en compte el poc nombre i la petita mida dels alvèols corticals d'*Helicolenus dactylopterus* (Muñoz *et al.*, 2002b), estructures relacionades amb l'enfortiment del corion que té lloc immediatament després de la fertilització de l'ou (Selman i Wallace, 1989; West, 1990). La funció protectora del corion en les espècies ovípare (Davenport *et al.*, 1981) és aparentment innecessària o bé molt menor en aquelles espècies en què l'ou es manté a l'interior de l'ovari. Així, la retracció dels ous detectada en *H. d. dactylopterus* en determinats medis de fixació podria també explicar-se pel fet de tenir un embolcall prim i delicat en comparació al d'espècies ovípare amb fertilització externa.

En aquest sentit, la particular estructura dels embrions de peix complica la seva criopreservació. Hagedorn *et al.* (1997) van descriure els principals factors que dificulten la congelació d'embrions d'espècies de teleostis. D'entre ells destaquem l'enorme compartiment amb vitel que tenen els ous, que té un comportament osmòtic particular; el petit valor de la ratio superfície/volum que dificulta l'influx i reflux de l'aigua o del crioprotector, necessaris per una congelació/descongelació exitosa. Finalment també cal mencionar l'elevada probabilitat de formació de gel intracel·lular que promou el trencament de la membrana.

Val a dir que com a mètode de preservació d'embrions a curt termini es poden congelar els embrions a temperatures properes als 0°C, temperatura que toleren fins a cert punt, però només amb la intenció de retardar el desenvolupament embrionari i poder establir els millors mètodes de preservació per a l'espècie objecte d'estudi. Zhang i Rawson (1995) van obtenir una supervivència pròxima al 100% dels embrions de l'espècie *Brachydanio rerio* (zebrafish) després de sotmetre'ls a 10 h d'exposició a 0°C. L'addició de metanol o glicerol al medi on es troben els embrions pot augmentar la seva supervivència després de la congelació, fet que ha estat comprovat en varies espècies, entre elles *Cyprinus carpio* (Ahammad *et al.*, 2002) i *Brachydanio*

rerio (zebra fish) (Hagedorn *et al.*, 1997; Liu *et al.*, 1997). Aquest benefici de les solucions crioprotectores ens pot ser de molta ajuda en treballs futurs per superar els handicaps que suposa la sensibilitat al refredament en la congelació d'embrions.

Els ous del penegal són lecitotròfics. La lecitotròfia és una interacció tròfica en la qual els embrions depenen exclusivament de les reserves endògenes presents a l'ou en el moment de la fertilització, un tipus de reproducció que es dona en pràcticament totes les espècies vertebrades ovíparas ovulíparas i zigòparas. Aquest mode de nutrició embrionària sovint és necessari en espècies que duen a terme la major part del seu desenvolupament fora del cos matern, com és el cas de l'espècie que ens ocupa. Els embrions lecitotròfics necessiten transformar les reserves de l'ou en teixits corporals, fet que els suposa pèrdues de massa orgànica que poden anar des del 25% fins al 50% depenent de l'espècie (Ranzi, 1932; 1934; Needham, 1942; Scrimshaw, 1945; Smith, 1957; Paffenhofer i Rosenthal, 1968; Thibault i Schultz, 1978; Turner, 1979).

Pel que fa referència a la massa d'ous que alliberen les femelles en la posta, es tracta d'una matriu de material gelatinós i de consistència tipus albúmina que els embolcalla.

La matriu gelatinosa ha estat descrita també en altres espècies emparentades amb el penegal com les del gènere *Scorpaena* (Orton, 1955; Muñoz, 2000; Sàbat, 2005) o del gènere *Sebastolobus* (Percy, 1962). Segons l'estudi de Koya i Muñoz (2007), existeix una estreta relació entre l'estructura ovàrica i el mode reproductiu dels escorpènids, de manera que es relaciona l'existència d'un ovari del tipus amb estroma central, com el que presenta *Helicolenus dactylopterus* i les espècies dels gèneres anteriorment mencionats, amb la producció d'aquesta massa gelatinosa d'ous. Normalment en aquesta massa d'ous cada ou madur està envoltat d'una capa de material gelatinós que omple la cavitat ovàrica, material que serà després expulsat mantenint la forma de l'ovari (Graham, 1939; Orton, 1955; Mito i Uchida, 1956; Percy, 1962; Fukutaki, 1963; Moyer i Zaiser, 1981; Kimura *et al.*, 1989; Koya i Matsubara, 1995).

En diverses espècies de teleostis s'ha descrit que el fluid que trobem dins la cavitat ovàrica era sintetitzat i secretat per la paret ovàrica (Yamamoto T.S., 1963; Yamamoto K., 1963; Fishelson, 1977; Brummett *et al.*, 1982; Lombardi i Wourms, 1985; Erickson i Pikitch, 1993), i també per l'epiteli de la lamel·la ovàrica tal i com s'ha demostrat en varies espècies d'escorpeniformes: *Sebastolobus alascanus* (Erickson i Pikitch, 1993), *Hexagrammos octogrammus* (Koya *et al.*, 1993d), *Sebastolobus macrochir* (Koya i Matsubara, 1995), *Alcichthys alcicornis* (Koya *et al.*, 1995a), *Scorpaenodes littoralis* (Yoneda *et al.* 2000) i en *H. d. dactylopterus* en el treball de Sequeira *et al.* (en revisió).

Al fluid ovàric se li han atribuït diverses funcions com el fet de prevenir l'activació de l'ou mitjançant el tancament del micròpil (Lahnsteiner *et al.*, 1997); mantenir la fertilitat de l'ou (Yamamoto, 1963; Takano *et al.*, 1973); facilitar l'expulsió dels ous en el moment de la posta (Yamamoto, 1963); formar postes en masses compactes amb materials de suport (Munehara, 1996); promoure la motilitat espermàtica (Scott i Baynes, 1980); i, en les espècies vivíparas, nodrir els embrions que es desenvolupen dins l'ovari (Gardiner, 1978). Ara bé, malgrat que s'ha corroborat la presència de lípids i carbohidrats en la composició de la matriu gelatinosa del penegal (Muñoz *et al.*, 2002a; Sequeira *et al.*, en revisió), així com en les espècies *Sebastolobus macrochir* (Koya i Matsubara, 1995) i *Alcichthys alcicornis* (Koya *et al.*, 1995a), el percentatge d'aquests dos components és relativament baix, fet que suggereix que la matriu gelatinosa del penegal no té cap tipus de funció en la nutrició dels embrions, tal i com sembla que passa en les espècies vivíparas (Gardiner 1978).

Ara bé, mentre que el component polisacàrid existeix àmpliament en el fluid ovàric dels teleostis (Koya i Matsubara, 1995), el caràcter eosinòfil no és comú. El fluid ovàric del penegal no es tenyeix amb el colorant eosina durant la major part del cicle anual. No obstant, a partir del final del període d'emmagatzematge i durant l'època de posta, crida l'atenció el canvi d'afinitat per aquest colorant que mostra el fluid, fet que evidencia un pH més bàsic. Així doncs, el procés de fertilització probablement s'inicia amb un canvi de pH controlat hormonalment. Una possible explicació d'aquest fenomen seria que la

naturalesa àcida del fluid podria mantenir els espermatozoides agrupats fins el moment en que són inclosos en les criptes. La mateixa naturalesa àcida del fluid ovàric podria inhibir la motilitat espermàtica fins el moment en què han de procedir a la fertilització (Sorokin, 1961; Hardy i Dent, 1986). Llavors, quan el pH del fluid ovàric esdevé més bàsic, això donaria lloc a la dispersió i activació dels grups d'espermatozoides, recentment alliberats de les criptes. Un cop activats, les cèl·lules sexuals masculines podrien nedar fins arribar als ous madurs i fertilitzar-los, tal i com suggereixen Muñoz *et al.* (2002a).

L'existència simultània d'embrions en diferents estadis de desenvolupament en una mateixa posta posa de manifest que els oòcits no són fecundats sincrònicament. Quan s'alliberen els espermatozoides de les criptes cap al lumen ovàric, aquests primer han de trobar els ous madurs, després trobar-ne el micròpil i finalment fertilitzar-los. Per tant, en funció de l'eficiència i/o rapidesa amb la que realitzin aquests passos, els ous començaran el seu desenvolupament més aviat o més tard. Com que els embrions d'una mateixa posta difereixen en els seus estadis de desenvolupament com a màxim varies hores, aquesta sembla ser una explicació coherent: les diferències en el desenvolupament embrionari depenen del temps que han trigat els espermatozoides a fertilitzar l'ou madur.

En aquest sentit, el fet de trobar estadis embrionaris més avançats en les mostres que tenen més quantitat de fluid ovàric ens fa pensar que el procés de producció de fluid ovàric és un procés gradual. D'aquesta manera, a mesura que es van fertilitzant els oòcits madurs aquests es van acumulant al fluid. Això explicaria el fet de trobar embrions una mica més avançats quan existeix molta quantitat de fluid ovàric, ja que són els primers oòcits fertilitzats que s'han anat desenvolupant fins que s'ha produït la quantitat de fluid necessària per tal que la femella realitzi la posta. Si el procés és dóna realment així, el temps que es requereix per produir el fluid suficient per a englobar la posta permet als embrions arribar com a màxim a l'estadi on diferenciem un eix embrionari amb alguns somites i una zona caudal i cefàlica evidents. Aquest estadi correspon a l'estadi 18-19 (inici de la formació de somites) de la classificació proposada per Yamada i Kusakari (1991).

Donat que l'estadi embrionari més avançat que hem observat és el citat de 16 somites, sumat al fet que la seva existència és molt esporàdica, creiem que probablement els embrions no arribin a fases de desenvolupament més avançades dins la femella.

Concretament, en les nostres observacions trobem que el 98% dels embrions estan formats per unes poques cèl·lules primerenques, mentre que els estadis de discoblàstula i l'immediatament següent només representen un petit percentatge (1,1% i 0,1% respectivament). De totes maneres, els càlculs serien aproximatiu ja que tal i com apunten Arezo *et al.* (2005) en el seu treball, existeixen diferències importants en el desenvolupament embrionari fins i tot dins d'una mateixa espècie de peix. Val a dir que també la variació en la mida dels ous és un tret comú en la majoria de peixos i s'ha determinat que està relacionat tant amb factors inherents com amb factors ambientals (Wootton, 1979). Sánchez i Acha (1988) determinaren que els ous madurs de la subespècie *Helicolenus dactylopterus lahillei* presenten una mida lleugerament superior als obtinguts per *H. d. dactylopterus*. En les seves mesures els ous tenen un eix llarg d'uns 0,91mm (dins un rang de 0,84-1,04) i un eix més curt de 0,78mm (rang: 0,68-0,86). Les mesures del treball de Sequeira *et al* (en revisió) sobre els embrions de penegal de les costes portugueses i l'arxipèlag de les Azores, també són superiors a les nostres: l'eix llarg fa uns 1,2mm i l'eix curt uns 0,9mm; variabilitat que segurament va lligada a l'elevada plasticitat reproductiva de l'espècie.

En l'experiment realitzat per Sánchez i Acha (1988), es recol·lectaren mostres de plàncton de la zona d'Uruguay i Buenos Aires que contenien ous d'*H. d. lahillei* de forma el·líptica, amb una clara gota lipídica i un vitel segmentat. Les masses d'ous foren incubades en aigua marina a temperatura constant (14°C) i anaren observant els canvis que patien els ous a mesura que avançava el seu desenvolupament. Després de 6 hores d'incubació, els ous es trobaven en l'estadi de blastodisc i després de 30 hores l'anell germinal format per l'embrió quasi tancava una meitat de la massa de vitel. Passades 60 hores des del començament de l'experiment, en l'embrió es diferenciaven perfectament la zona cefàlica i la caudal i s'arribaven a comptar fins a 16 somites. La majoria d'ous capturats en aquest mateix estudi estaven en l'estadi de

desenvolupament més avançat que hem pogut observar en les nostres mostres, el de 16 somites, de manera que el fluid mucós que engloba els embrions en el moment de la posta no sembla durar massa temps. Així doncs, la seva funció sembla estar relacionada amb el procés de fertilització, amb el manteniment dels embrions durant els primers estadis de desenvolupament dins de l'ovari, i amb el propi fenomen de la posta.

Malgrat el fet que es tracta d'un experiment de laboratori, i que probablement les condicions experimentals poden fer variar lleugerament els resultats respecte els que s'obtindrien en el medi natural, basant-nos en aquest treball es pot afirmar que el temps en el que els embrions en desenvolupament estan dins del cos de la femella és d'entre 2 i 3 dies com a màxim.

Així doncs, en l'espècie que ens ocupa s'alliberen embrions en estadis primerencs i la resta del desenvolupament embrionari es completa fora el tracte reproductor matern, afirmació que corrobora que l'espècie en estudi és zigòpara. La zigoparitat definida segons el treball de Wourms (1991) es dona quan l'oòcit o ou és fertilitzat dins el tracte reproductor de la mare i l'embrió és alliberat del tracte en un estadi de desenvolupament molt primerenc, de manera que la majoria d'estadis de desenvolupament tenen lloc a l'exterior del cos de la mare. En canvi, l'embrioparitat existeix quan els esdeveniments que van des de la fertilització fins a l'eclosió es donen prèviament a l'alliberament de l'embrió del tracte genital femení.

Tanmateix, cal tenir en compte que en el treball sobre el penegal en aigües atlàntiques realitzat per White *et al.* (1998), s'estima un període de gestació d'entre 20 i 30 dies. Els autors dedueixen aquesta dada a partir del fet que ja al desembre s'observen oòcits en vitel·logènesi i que detecten els embrions a finals del mes de gener. Ara bé, en el cas que aquest període de gestació fos correcte, considerem que en els mesos de febrer i març es trobarien embrions en estadis molt més avançats, cosa que no es dona. Creiem que l'explicació es troba en el fet que es tracta d'una espècie de posta múltiple, és a dir, fa més d'una posta a cada estació reproductiva, tal i com indica la distribució de diàmetres dels oòcits dins de l'ovari al llarg del cicle anual (Muñoz i Casadevall, 2002; Muñoz *et al.*, en revisió). El mateix tipus de posta s'ha determinat, per exemple, en algunes espècies de *Sebastes* (MacGregor, 1970) i en

Sebastes paucispinis (Moser, 1967b), en les que també es detecten simultàniament embrions o larves i ous en procés de vitel·logènesi.

Així doncs, tant els nostres resultats com els de Sequeira *et al.* (2003) suggereixen que el temps de retenció dels embrions dins del cos matern és molt menor al de les espècies d'escorpeniformes vivíparas.

En general, les espècies del gènere *Sebastes*, les quals alliberen larves completament formades, tenen un període de gestació de 30-60 dies (Fujita, 1958; Moser, 1967a; Boehlert i Yoklavich, 1984; Bowers, 1992; Yamada i Kusakari, 1991; Nichol i Pikitch, 1994), malgrat que les taxes de desenvolupament i els temps fins l'eclosió o l'alliberament de les larves difereixen àmpliament entre espècies pertanyents a un mateix gènere. Per exemple, en *Sebastes schlegeli*, el temps que transcorre des de la fertilització fins a l'alliberament de les larves fou de 48 dies a 9,8°C (Yamada i Kusakari, 1991), per *Sebastes oblongus* Günter fou de 39 dies a una temperatura d'entre 9 i 12,8°C (Byun *et al.*, 1995) i en l'espècie *Sebastes flavidus* Eldridge *et al.* (2002) determinaren que la mitjana de temps necessari per arribar a la posta era d'uns 29,2 dies a 12°C. En aquesta espècie el blastodisc ja es podia observar 2 o 3 dies després de la fertilització de l'ou. Altre cop, cal tenir en compte que les diferències en els temps de gestació poden deure's, en part, a diferències en la temperatura de l'aigua, donat que temperatures més elevades poden accelerar el desenvolupament embrionari.

En el Mediterrani Occidental, la posta del penegal sembla que bé determinada per la temperatura de l'aigua. Diversos autors conclouen que aquesta es dona els mesos d'hivern (Hureau i Litvinenko, 1986; Whitehead *et al.*, 1986; Muñoz *et al.*, 1999; Vila, 2007). En aigües més fredes, com les que envolten les Illes Britàniques, la posta sol donar-se en la transició de primavera a estiu (Kelly *et al.*, 1999; Allain, 2001).

El fet de retenir els embrions dins el cos matern permet a les femelles direccionar el seu esforç reproductiu per la supervivència dels seus descendents. Això implica que, en principi, no es produeixen grans quantitats d'individus que s'alliberen en estat precoç, sinó que se'n desenvolupen menys però que assoleixen estadis de desenvolupament molt més avançats i que, per

tant, tenen més probabilitats de supervivència. En aquest sentit, però, cal destacar que la fecunditat estimada per aquesta espècie és relativament elevada tenint en compte que és una espècie amb fertilització interna i zigópara. Segons el treball de Muñoz *et al.* (en revisió), aquesta fecunditat és comparable, i en alguns casos superior, a la d'altres espècies relacionades que presenten fertilització externa i oviparisme simple (Muñoz *et al.*, 2003; 2005).

Un altre factor a tenir present és que la massa corporal materna promou la supervivència dels embrions degut al fet que evita els canvis bruscs de temperatura de l'ambient, factor important pel fet que el desenvolupament embrionari dels peixos, amfibis i rèptils és altament dependent de la temperatura. A més a més, la retenció d'embrions dins el cos de la mare els proporciona un ambient iònic, d'hidratació, etc., idonis pel seu perfecte desenvolupament.

En algunes espècies ovíparas les taxes de mortalitat embriònica i larval degut a la depredació són força elevades. Amb la zigoparitat i l'embrioparitat, els individus en desenvolupament que estan retinguts dins el cos de la mare estan protegits dels depredadors. A més a més, el sistema immunològic de la femella pot també donar-los certa protecció contra infeccions bacterianes o micològiques. Per últim, l'alliberament d'embrions que ja han iniciat el seu desenvolupament pot fer minvar significativament la mortalitat dels ous deguda a la depredació. Així, comparativament a les espècies ovíparas, l'estratègia reproductiva d' *H. dactylopterus* -la zigoparitat- assegura una major supervivència de la descendència.

4. DISCUSSIÓ GENERAL

4. DISCUSSIÓ GENERAL :

En aquesta discussió final ens proposem donar una visió sintetitzada i global dels diferents aspectes que ha posat de manifest l'estudi del procés d'emmagatzematge d'esperma en *Helicolenus dactylopterus*. Les qüestions que fan referència exclusiva a un dels capítols analitzats ja s'han presentat en les discussions específiques de cada apartat de la tesi; de manera que a continuació el que es presenta és una discussió que intenta relacionar els aspectes tractats en les diferents parts del treball.

En primer lloc volem destacar que hem detectat similituds citològiques entre les cèl·lules de Sertoli dels testicles i les cèl·lules epitelials que formen les criptes ovàriques d'emmagatzematge d'esperma. Aquest dos tipus de cèl·lules podrien compartir algunes funcions, ja que les dues són crucials pel desenvolupament i la supervivència de les cèl·lules espermàtiques, unes dins el testicle i les altres dins de l'ovari. Observacions al microscopi òptic i electrònic ens han mostrat que els dos tipus de cèl·lules presenten similituds relacionades amb la nutrició, la protecció i l'eliminació de les cèl·lules sexuals masculines.

Les cèl·lules de Sertoli procuren un microambient i un suport citoarquitectural pel desenvolupament de les cèl·lules espermatogèniques en desenvolupament, al mateix temps que regulen directament l'endocrinologia reproductiva del mascle. Aquesta funció és duta a terme, en part, a través de la secreció d'una gran varietat de proteïnes. A mesura que els cists espermatogènics creixen i maduren, les cèl·lules de Sertoli es van també modificant i, en el moment de l'espermiaació, contenen abundant reticle endoplasmàtic llis i rugós, ribosomes i algunes vesícules. Per altra banda, les imatges al microscopi electrònic ens han revelat que les cèl·lules criptals també presenten un citoplasma ric en reticle llis i rugós i, específicament durant l'època de post-posta, contenen alguns lisosomes electrodensos.

En les cèl·lules de Sertoli aquests orgànuls participen en la síntesi de diversos productes de secreció, com ara proteïnes de transport per donar suport nutritiu a les cèl·lules germinals, la matriu extracel·lular, i molècules d'adhesió per assegurar les apropiades interaccions cèl·lula-cèl·lula (Skinner, 2005). De la mateixa manera, les cèl·lules criptals també semblen secretar, mitjançant exocitosi, alguns factors nutricionals per tal de nodrir les cèl·lules espermàtiques emmagatzemades, tal i com hem pogut observar mitjançant el nostre estudi ultraestructural.

Cal remarcar també que ambdós tipus de cèl·lules estan unides a les cèl·lules veïnes mitjançant un gran nombre d'unions. En les cèl·lules de Sertoli, quan les cèl·lules germinals estan en un estadi avançat de desenvolupament, un gran nombre d'unions desmosòmiques i complexes interdigitacions estableixen el que es coneix com la "blood-testis barrier" (Nagahama, 1983), principal responsable de la protecció de les cèl·lules germinals envers agents externs. En les cèl·lules criptals hem constatat que els nombrosos desmosomes que uneixen les cèl·lules veïnes impedeixen el pas de determinades substàncies cap a l'interior de les criptes, conferint així també als espermatozoides emmagatzemats certa protecció.

Per últim, tant entorn els cists espermatogènics com entorn les criptes intraovàriques d'emmagatzematge, s'han detectat fagòcits. Aquests semblen ser els encarregats d'eliminar les cèl·lules espermàtiques no viables en ambdós tipus de gònada. En el cas dels mascles, durant l'espermiació una funció important de les cèl·lules de Sertoli és la de fagocitar els cossos residuals o les restes citoplasmàtiques de les espermàtides (Grier, 1993). Val a dir que els fagòcits, i en algun cas els granulòcits, han estat encara molt més evidents entorn les criptes intraovàriques d'esperma. La raó podria ser que, a causa del llarg període durant el qual els espermatozoides romanen dins de l'ovari, abundin els que esdevenen inviables i que han de ser eliminats per aquest tipus de cèl·lules.

Les citades similituds ens han portat a pensar en un desenvolupament embrionari comú pels dos tipus cel·lulars. En aquest sentit, val a dir que els epitelis germinals

en mascles i femelles tenen un origen similar. Les cèl·lules germinals primordials migren cap a la cresta germinal durant el desenvolupament embrionari, on junt amb les cèl·lules somàtiques desenvolupen l'epiteli germinal (Strüssmann i Nakamura, 2002; Yoshizake *et al.*, 2002). Aquestes cèl·lules germinals primordials tenen la capacitat d'esdevenir llinatges cel·lulars masculins o femenins, produint doncs tant ovaris com testicles. Donat que tenen un mateix origen, les cèl·lules germinals en mascles i femelles són homòlogues, com també ho són les cèl·lules somàtiques dels testicles i els ovaris, entre elles les cèl·lules de Sertoli i les cèl·lules fol·liculars, respectivament. Ara bé, mentre que es coneix amb seguretat que els fol·licles ovàrics dels teleostis deriven completament de l'epiteli germinal (Grier, 2000; Parenti i Grier, 2004; Grier *et al.*, 2005), no s'ha trobat informació sobre l'origen concret de l'epiteli lamel·lar que dona lloc a les criptes d'emmagatzematge d'esperma. Per tant, les similituds citològiques entre les cèl·lules de Sertoli i les cèl·lules ovàriques criptals podrien no ser degudes a un origen cel·lular comú, sinó que podrien posar de manifest caràcters desenvolupats a posteriori pel fet d'estar, tant unes com les altres, en contacte directe amb els espermatozoides.

Investigacions més a fons determinaran quin tipus de proteïnes són secretades per les cèl·lules criptals i si aquestes també secreten algun tipus d'hormones cap als espermatozoides de dins les criptes, tal i com ens fa pensar la notable quantitat de reticle endoplasmàtic llis i rugós que existeix en els seus citoplasmes. Per altra banda, un estudi enfocat al desenvolupament embrionari dels dos tipus de cèl·lules que hem comparat probablement també aportaria informació interessant.

Pel que fa al cicle reproductiu de mascles i femelles, tant el seguiment dels canvis histològics que pateixen les gònades com les seves variacions en pes (evolució anual de l'índex gonadosomàtic), posen de manifest que la maduració de les cèl·lules sexuals masculines i femenines no coincideix en el temps. Així, tot i que femelles i mascles inicien un nou cicle reproductiu aproximadament al mateix temps (març i abril, respectivament), les femelles perllonguen la fase de

desenvolupament inicial fins a principis del següent any. Contràriament, els mascles de penegal ja contenen petites quantitats d'espermatozoides madurs a partir de finals del mes de juliol, fet que els confereix la capacitat d'inseminar femelles des d'aquesta data fins a principis del següent any, quan té lloc la posta. Cal tenir en compte, doncs, que així com els mascles poden produir esperma durant un període de temps molt perllongat, les femelles només contenen oòcits vitel·logènics madurs durant uns tres mesos. De fet, entre els escorpènids és relativament comú que l'aparellament comenci molt de temps abans de la maduració i fecundació dels ous, i no és rar que acabi un període de temps abans (Lisovenko, 1978; Takahashi *et al.*, 1991; Fujita i Kohda, 1996).

En el cas del penegal, els espermatozoides que han anat entrant dins de l'ovari durant bona part de l'any, són emmagatzemats dins de criptes especialitzades per tal d'esperar fins que les cèl·lules sexuals femenines assoleixen la maduresa. En aquest moment seran alliberats al lumen ovàric i procediran a la fecundació. Així doncs, és evident que en l'espècie en estudi existeix un retard de diversos mesos entre la inseminació i la fecundació. Retards d'entre 1 i 5 mesos també s'han documentat en espècies del gènere filogenèticament emparentat *Sebastes*. Es considera un fenomen molt freqüent en el gènere i respon a l'estratègia reproductiva dels mascles per tal d'adaptar-se als canvis endocrins lligats a factors ambientals (Takahashi *et al.*, 1991; Echeverria, 1987).

Les femelles de penegal semblen tenir zones de posta determinades i que poden estar situades en zones de difícil accessibilitat, per exemple canons submarins, o bé a més profunditat que no a la que pesquen els pescadors del Mediterrani. A més, cal remarcar que *H. dactylopterus* presenta una clara distribució batimètrica en funció de la talla, essent els individus de menor talla els que estan en aigües més someres i els més grans progressivament es troben a més profunditat (Massutí *et al.*, 2000a; 2001; Ribas *et al.*, 2006). La relació positiva entre la talla i la profunditat implica una migració cap a aigües més profundes durant l'ontogènia (Cushing, 1976). Així, per una banda les femelles més grans solen trobar-se a major profunditat i, per altra banda, aquestes probablement fan la posta en zones

rocoses de difícil accés per les barques de ròssec.

La baixa densitat poblacional que existeix a aquestes profunditats (MacPherson i Duarte, 1991; Figueredo *et al.*, 1995; Kelly *et al.*, 1999; Massutí *et al.*, 2000a), així com la possible migració de les femelles madures a zones de posta específiques, pot haver comportat la necessitat d'un llarg període de producció d'esperma per part dels mascles, implicant així la necessitat d'emmagatzemar aquest esperma per part de les femelles. Aquesta estratègia evita el perill de que la femella no coincideixi amb un mascle en el moment precís de l'any en el que ella assolix la maduresa i necessita fertilitzar els ous.

Sabem doncs que els mascles de l'espècie en estudi tenen espermatozoides madurs durant molts mesos al llarg de l'any, de manera que això postula la possibilitat que realitzin repetides inseminacions. Evidències que recolzen la probable còpula múltiple són, per una banda, el número creixent de criptes plenes d'espermatozoides a mesura que avança el cicle reproductor de la femella i, per altra banda, la presència d'espermatozoides flotant lliurement dins d'ovaris on ja existien criptes plenes d'espermatozoides. Aquests fets suggereixen la possibilitat que els espermatozoides de l'interior de les criptes i els que estan lliures per l'espai luminal provenguin de diferents mascles, malgrat que caldria corroborar-ho mitjançant anàlisis genètiques. En aquest sentit, doncs, la producció d'esperma al llarg de tants mesos podria també representar un mecanisme relacionat amb la competència espermàtica.

Indiscutiblement, els peixos són el grup animal que mostra la més àmplia gamma de competència espermàtica (Stockley *et al.*, 1997). La diversificada existència d'adaptacions a aquest tipus de competència pot deure's, en part, a la prevalença de la fecundació externa en els Teleostis. Malgrat que amb la fecundació interna s'assumeix que la importància de la competència espermàtica es veu dramàticament reduïda, la probable existència d'esperma de diferents mascles dins d'un mateix ovari suggereix que aquest mecanisme pot tenir la seva

importància en l'espècie en estudi.

El paper de la competència espermàtica en la selecció natural ha estat normalment ignorat (Darwin, 1871) o infraestimat (Anderson, 1994), principalment a causa de la dificultat de mesurar la freqüència en la qual una femella copula amb més d'un mascle al llarg d'una època reproductiva (Birkhead i Moller, 1998). Per altra banda, Eberhard (1996) suggereix que molts dels trets que sempre s'ha pensat que han evolucionat a través de la selecció natural en els mascles, com per exemple la mida de l'ejaculat, han hagut de coevolucionar també en les femelles. Així, per exemple, les femelles han hagut de desenvolupar zones d'emmagatzematge suficients per permetre guardar els diferents espermes, i com a resposta a això els mascles haurien desenvolupat ejaculats prou grans per tal d'omplir del tot aquestes zones d'emmagatzematge.

És un fet comprovat en diferents taxons que els mascles poden tenir diferent capacitat de fertilització (Lanier *et al.*, 1979; Lewis i Austad, 1990; Dziuk, 1996), la qual sol tenir base genètica (Dziuk, 1996). Ara bé, en la capacitat de fertilització les femelles també poden tenir la seva influència, ja que poden preferir l'esperma de determinats mascles i transportar i retenir-ne una major proporció que no el dels altres. En els casos en els que les femelles són forçades a copular, existeix una forta pressió selectiva sobre elles per desenvolupar mecanismes fisiològics interns per tal de poder seleccionar després el millor esperma. Actualment desconeixem si en el penegal existeix aquest tipus de mecanisme de control intern per part de les femelles; no obstant, els espermatozoides detectats flotant per l'espai interlamel·lar sense ser inclosos en cap cripta, tant podrien ser acabats d'arribar a l'ovari i apunt de ser englobats pròximament, com potser descartats per la femella per formar part del seu pool d'esperma emmagatzemat, a causa d'una mala qualitat del mascle inseminador.

A més dels mecanismes interns de selecció de l'esperma que arriba dins de l'ovari, sovint les femelles són capaces d'influir directament sobre quin mascle les insemina a través del seu comportament. No obstant, les evidències sobre aquests

fenòmens encara són limitades. Segons el treball de Muñoz i Casadevall (2002), els mascles de penegal assoleixen la maduresa sexual amb mides mínimes inferiors que les femelles (13cm de longitud estàndard pels mascles i 14,5 cm per les femelles), de manera que aquestes potser podrien oposar suficient resistència a la còpula per tal de seleccionar els mascles més potents.

Les femelles de penegal possiblement aposten per copular amb múltiples mascles per tal d'obtenir certs beneficis, directes o indirectes. Si en l'espècie en estudi existeix certament la competència espermàtica, aquesta pot afectar de diferents maneres la qualitat de la descendència produïda, sobretot en termes de diversitat, atractiu i viabilitat de la mateixa. En aquest sentit, aquest tipus de competència pot resultar en la producció d'una descendència genèticament més diversa que, sota condicions ambientals determinades, tindran més possibilitats de sobreviure i reproduir-se (Williams, 1975; Loman *et al.*, 1988; Ridley, 1993; Brown, 1997). És un fet corroborat que les femelles solen produir un nombre major d'ous que els que realment acaben essent fertilitzats, i la qualitat d'aquests ous determina si acabaran formant part de la descendència (revisat per Moller, 1997). Les femelles que, al contrari que en el penegal, estan limitades per la disponibilitat d'esperma, corren el risc potencial d'utilitzar esperma de menor qualitat per la fertilització (Lodge *et al.*, 1971). Així, com major sigui la fracció d'esperma emmagatzemat, més possibilitats entre les que escollir tindrà la femella per poder utilitzar els millors espermatozoides per la fertilització, i com a conseqüència la qualitat de la descendència es veurà beneficiada.

La particularitat més destacable de l'emmagatzematge intraovàric d'esperma d'*H. dactylopterus* és el fet que existeixen unes estructures especialitzades i únicament destinades a guardar l'esperma dins de l'ovari fins el moment de la fecundació. Entre les espècies que guarden els espermatozoides intraovàricament, els mecanismes d'emmagatzematge difereixen de manera notable. Així, mentre que algunes no semblen presentar cap tipus de modificació relacionada amb

l'emmagatzematge de les cèl·lules sexuals masculines en els seus ovaris, d'altres presenten estructures clarament diferenciades. Ara bé, cal destacar que en cap de les espècies descrites en aquest sentit trobem un grau d'especialització tan elevat com en el penegal.

En referència en primer lloc a l'emmagatzematge d'esperma dins dels testicles, s'ha descrit per exemple que en ciprínids, salmònids i en l'espècie *Esox lucius*, l'espermatogènesi comença en l'època prèvia a la posta i l'esperma madur s'acumula en el conducte espermàtic molt abans de l'època de posta (Hoffman *et al.*, 1980; Rasotto *et al.*, 1987; Wootton, 1990), com també passa en l'espècie que estudiem. Probablement, en aquestes espècies el conducte espermàtic i les seves secrecions juguen un paper en la formació i la regulació del fluid seminal per una banda; i en la nutrició, emmagatzematge i reabsorció dels espermatozoides per l'altra (Lahnesteiner *et al.*, 1993a,b; Lahnesteiner *et al.*, 1994).

En el cas del penegal hem descobert que és justament a l'interior del conducte espermàtic on l'espermatozoide adquireix la bossa citoplasmàtica que l'ajudarà a sobreviure al llarg temps d'emmagatzematge que l'espera dins de la femella.

Si ens referim a l'emmagatzematge d'esperma dins dels ovaris, és interessant tenir present el fet que ja en l'any 1908, Philippi va descriure que l'esperma detectat dins de l'ovari de dues espècies del gènere *Girardinus* era engolit per pseudopodis de la paret dorsal de l'ovari. Pel que sabem, això no ha estat confirmat ja que en aquestes dates es limitaven a l'observació sota el microscopi òptic. Tanmateix, més tard Burns *et al.* (1997) van observar que en varies espècies amb fecundació interna, les cèl·lules espermàtiques estan ubicades en invaginacions de la cavitat ovàrica i que poden ser engolides cap a dins del citoplasma de l'epiteli.

Els còtids marins *Pseudoblennius cottoides*, *P. percoides*, *Furcins ishikawae* i *d'Alcichthys alcicornis* són espècies d'escorpeniformes amb associació gamètica interna. Aquest peculiar mode de reproducció significa que l'esperma és introduït dins de l'ovari mitjançant còpula i seguidament els espermatozous entren en el

canal micropilar dels ous ovulats en la cavitat ovàrica. Ara bé, la real fusió entre l'ou i l'espermatozoide no es dona fins que els ous són alliberats al medi marí. Mentre que en el cas d'*A. alcornis* l'esperma no presenta cap mena d'organització relacionada amb el seu emmagatzematge (Koya *et al.*, 1997), en la resta d'espècies citades, en les que les cèl·lules sexuals masculines són mantingudes més temps, l'esperma no està dispers pel lumen ovàric sinó que està alineat perpendicularment a la paret ovàrica de la part posterior de l'ovari (Shinomiya, 1985). En observacions al microscopi electrònic s'ha vist que els caps dels espermatozoides estan adherits a l'epiteli ovàric per estructures tipus glicocàlix (Koya *et al.*, 2002).

Tampoc en els gèneres d'escorpeniformes vivípars *Sebasticus* i *Sebastes* existeix cap tipus d'estructura especialitzada en l'emmagatzematge d'esperma (Tateishi *et al.*, 1958; Moser, 1967b; Takemura *et al.*, 1987; Nichol i Pikitch, 1994), malgrat que a vegades l'esperma pot envair l'epiteli fol·licular, com en *Sebastes schlegeli* (Mori *et al.*, 2003).

Així doncs, és destacable l'existència d'estructures intraovàriques exclusivament destinades a l'emmagatzematge dels espermatozoides que tenen diferents espècies del gènere *Helicolenus*. A més de les descrites en *H. dactylopterus* (Muñoz *et al.*, 1999, 2000; Vila, 2007a, b i el present treball), també s'han observat en *H. lengerichi* (Lisovenko, 1979) i en *H. hilgendorfi* (Koya i Muñoz, 2007).

Cal recalcar que un període d'emmagatzematge tan perllongat requereix de sistemes de protecció i nutrició per les cèl·lules sexuals masculines capturades dins les criptes. Tal i com ja s'ha explicat en la discussió de l'apartat corresponent, la protecció s'aconsegueix a través de nombroses unions fortes i desmosòmiques entre les cèl·lules criptals, definint així l'espai d'emmagatzematge i protegint alhora els espermatozoides de possibles agressions externes. Pel que fa a la nutrició, aquesta s'acompleix a través de dues vies: les pròpies reserves que contenen els espermatozoides dins les bosses citoplasmàtiques dels seus caps quan entren a l'ovari, i que van consumint mentre estan dins les criptes; i a partir de la secreció per part de l'epiteli criptal de material nutritiu alliberat dins l'espai

d'emmagatzematge.

A més, el pH àcid del fluid ovàric pot inhibir la motilitat espermàtica fins al moment de la fertilització (Sorokin, 1961; Hardy i Dent, 1986), reduint així els requeriments metabòlics dels espermatozoides durant el llarg període d'emmagatzematge. Val a dir que, tot i que l'esperma està aïllat dins de les criptes, quan aquestes es formen possiblement part d'aquest fluid ovàric és capturat juntament amb els espermatozoides. La secreció d'aquest fluid es dona des del principi del cicle anual reproductiu, de manera que quan els primers espermatozoides són introduïts dins de l'ovari ja existeix certa quantitat de fluid dins la cavitat gonadal.

En el moment en què la femella ja disposa d'òcits madurs, el llarg període d'emmagatzematge d'esperma arriba a la seva fi. Els mecanismes d'alliberació dels espermatozoides encara retinguts dins de les criptes ovàriques han estat descrits per Muñoz *et al.* (2000), els quals relacionen l'existència de musculatura llisa entorn les criptes, juntament amb la gran quantitat de fibres perinuclears que presenten les cèl·lules criptals, amb la possibilitat de que les cèl·lules sexuals masculines siguin expulsades de les criptes mitjançant contraccions espasmòdiques de l'epiteli criptal. És llavors, quan s'aproxima el moment de la fecundació, quan el fluid ovàric d'*H. dactylopterus* esdevé més bàsic, fet que podria donar lloc a la dispersió dels paquets d'espermatozoides alliberats al lumen ovàric i a la seva activació. De fet, ja l'any 1961 Sorokin proposà que els espermatozoides introduïts dins les femelles en l'espècie *Sebastes marinus*, eren emmagatzemats en un estat d'inactivitat fisiològica durant quatre o cinc mesos abans de la fertilització, i que en el moment apropiat aquests espermatozoides eren activats per canvis de pH del fluid ovàric.

Els temps de gestació han estat acuradament determinats en diferents espècies d'escorpènids: un mes en *Sebastes paucispinis*, 37 dies en *S. melanops* i 51,5 dies a 10,6°C en *S. schlegeli* (Moser, 1967a; Boehlert i Yoklavich, 1984; Boehlert *et al.*, 1986). Més recentment, i utilitzant una metodologia més precisa, Yamada i

Kusakari (1991) determinaren que el període de gestació de *S. schlegeli* és de 43.9 dies a 10,6°C.

L'anàlisi del desenvolupament embrionari intraovàric dut a terme en el present estudi sobre el penegal mostra que els embrions es mantenen dins la femella fins a un màxim de 2 dies.

L'anàlisi de la posta a nivell poblacional que hem fet conjuntament amb Muñoz *et al.*, i que actualment es troba en revisió, mostra que la freqüència mitjana de posta d'aquesta espècie és entorn els dos dies. Aquests resultats coincideixen plenament amb els resultats obtinguts en el present treball, ja que l'estadi més avançat de desenvolupament embrionari trobat és el de 16 somites. Seguint el treball de Sánchez i Acha (1988) es pot determinar que per tal d'arribar a aquest estadi el temps aproximat és d'uns dos dies, coincidint doncs amb el temps que triguen les femelles en fer una nova posta.

L'estratègia d'alliberar els ous al llarg d'un període prolongat de temps pot ser avantatjós per la probabilitat de supervivència de la descendència (Lambert i Ware, 1984), o pot ser entesa com una necessitat en espècies amb elevades fecunditats, on existeix una limitació física d'espai (Forham i Trippel, 1999). Aquesta segona explicació és encara més evident o marcada en el penegal degut al fet que l'augment de volum dels ovaris no només és causat per la hidratació dels oòcits sinó també per l'acumulació de grans quantitats de matriu gelatinosa que envolta els ous, així com a l'augment del volum dels ous causat pel desenvolupament embrionari.

La culminació del patró de pondre en una massa gelatinosa lligat amb el fenomen de la viviparitat dins del gènere *Helicolenus* es troba en *H. percoides* (Wourms, 1991), la posta del qual consta d'una gran matriu gelatinosa (150ml) que engloba 80000 o més embrions completament formats, els quals s'alliberen per si sols en 20 minuts, a mesura que la massa es dissol. En algunes espècies de *Sebastes*, també existeix una matriu gelatinosa que envolta els embrions completament formats, com per exemple en *S. schlegeli* (Kusakari *et al.*, 1977), el qual presenta un tipus modificat de matrotrofia (Boehlert *et al.*, 1986).

Com a punt final referent a l'estratègia reproductiva del penegal, volem també destacar que a través dels canvis en els mecanismes endocrins que controlen la retenció dels embrions i la velocitat del desenvolupament dels embrions retinguts, és possible separar en el temps els esdeveniments de la fertilització i el part. En el cas del penegal a això s'hi afegeix el fet que, gràcies a l'emmagatzematge intraovàric d'esperma, la còpula esdevé alguns mesos abans de la fertilització (fusió dels nuclis gamètics) i l'alliberament de la prole, de manera que això els permet escollir el moment, òbviament sempre dins un marge, per tal que els embrions en desenvolupament trobin unes condicions ambientals favorables i amb bona disponibilitat de recursos. A més, el fet de retenir els embrions evita a les femelles algunes interaccions competitives per establir i mantenir els llocs de posta.

Així, el penegal presenta una estratègia reproductiva evidentment eficaç pel fet que combina la còpula amb diversos mascles, l'autonomia de les femelles per fecundar els seus ous madurs en el moment adequat gràcies a l'emmagatzematge intraovàric d'esperma, l'inici del desenvolupament embrionari dins la mare i l'alliberament de la posta envoltada per una matriu gelatinosa per tal d'assegurar una major supervivència de la prole, i finalment la realització de varies postes per poder aconseguir fecunditats més elevades. Tot això situa a aquesta espècie en el punt de mira d'estudis científics relacionats amb l'estudi de la biologia general d'estratègies reproductives particulars.

Per últim, ens proposem situar els resultats del present treball dins l'estudi del context filogenètic de l'espècie que ens ocupa.

La fecundació externa i l'oviparitat són la regla general de la majoria de peixos teleostis, amb la posta d'un elevat nombre d'ous (Melinger, 2002). En canvi, la

fecundació interna i la viviparitat es donen dins les famílies que solen pondre un nombre reduït d'ous degut al fet que el desenvolupament embrionari es duu a terme dins de l'ovari (Wourms, 1991). Aquest mode de reproducció el podem trobar dins els Ciprinodontiformes, els Perciformes, i també en famílies com els Scorpaenidae o els Zoarcidae (Wourms *et al.*, 1988). Ara bé, només 510 de les 20.000 espècies estimades de peixos teleostis són vivípars (Hoar, 1969; Wourms, 1981; Wourms *et al.*, 1988), aspecte que porta a considerar l'oviparitat com una forma no-especialitzada o primitiva de reproducció, a partir de la qual hauria evolucionat la viviparitat (Wourms, 1991).

La família Scorpaenidae (sensu Nelson, 2006) és un grup molt diversificat que consta de 56 gèneres i 418 espècies distribuïdes des de la costa fins a les profunditats marines, i des de l'àrtic fins als mars tropicals arreu del món, associades als esculls coral·lins en els tròpics o als fons rocosos en les aigües més fredes. Dins la seva subfamília Sebastinae, que tradicionalment inclou els gèneres: *Hozukius* (amb 2 espècies), *Helicolenus* (amb 14 espècies), *Sebastes* (amb 105 espècies) i *Sebasticus* (amb 3 espècies), podem afirmar que la fecundació interna és la regla general (Barsukov, 1981; Boehlert i Yoklavich, 1984; Nelson, 1994). Aquesta subfamília és un grup interessant pel fet que els seus membres representen diferents estadis en la transició de l'oviparitat a la viviparitat matrotrofica; la gestació és intraluminal i els embrions normalment es desenvolupen totalment dins l'embolcall de l'ou.

No hi ha un acord comú sobre la relació existent entre els gèneres *Helicolenus* i *Sebastes*. Matsubara (1943) derivava *Helicolenus* de *Sebastes* mentre que Barsukov (1981) i altres autors afirmen que *Sebastes* prové filogenèticament d'*Helicolenus*.

L'evolució de la viviparitat en els escorpeniformes fou representada en una taula per Wourms (1991), correlacionant informació sobre els modes reproductius de cada espècie amb les relacions filogenètiques dins de l'ordre. L'autor considera que els gèneres vivípars com *Sebastes* i *Sebasticus* haurien evolucionat a partir

d'un escorpènid ancestre ovípar, com *Scorpaena*, passant per la zigoparitat o l'embrioparitat que presenta el gènere *Helicolenus*.

Tres punts refermen aquesta teoria: 1) *Sebastes*, *Sebasticus* i *Helicolenus* estan molt relacionats dins els escorpènids, i sovint es classifiquen dins el mateix grup sistemàtic (Barsukov, 1981; Ishida, 1994); 2) El gènere *Helicolenus* presenta estadis de transició de l'oviparitat a la viviparitat (Graham, 1956; Krefft, 1961; White *et al.*, 1998; Muñoz *et al.*, 1999; Koya i Muñoz, 2007); 3) Els ous són acompanyats per una massa gelatinosa en les espècies ovípare, zigòpare i embriòpare (Sparta, 1928; 1941a,b; Krefft, 1961; Pearcy, 1962; Fishelson, 1977), i una massa gelatinosa similar és observada en els ovaris d'espècies vivípare (Kusakari, 1995).

Així, tal i com hem comentat, malgrat que diferents autors han analitzat les relacions filogenètiques dels escorpènids (Ishida, 1994; Imamura, 1996, 2004; Mandrytsa, 2001), la relació entre els diferents gèneres pertanyents a la família Scorpaenidae és encara poc clara.

Dins d'aquest context filogenètic ens proposem relacionar diverses característiques morfològiques i fisiològiques dels gèneres *Scorpaena*, *Helicolenus* i *Sebastes* que creiem que podrien ser importants per la discussió sobre les relacions de parentesc d'aquest grup de peixos.

*Primerament, i fent referència al tipus de reproducció, *Helicolenus dactylopterus* és una espècie zigòpara, terme que es refereix a una condició ovípara en la que els ous fertilitzats (és a dir, els zigots) són mantinguts dins el tracte reproductor de la femella per curts períodes de temps abans de ser alliberats al medi (Wourms *et al.*, 1988). En termes reproductius, l'espècie en estudi es troba en una posició intermèdia entre espècies estrictament ovípare, com les dels gèneres *Scorpaena* i *Sebastolobus*, i espècies típicament vivípare com les del gènere *Sebastes*. Degut a això la informació sobre la biologia reproductiva del penegal ha estat molt contradictòria: mentre que alguns autors el consideraven clarament ovípar (Dieuzeide *et al.*, 1955; Boutière, 1958; Nouar, 2003), d'altres el definien com a

vivípar (Krefft, 1961; Haigh, 1972; Moser *et al.*, 1977; Washington *et al.*, 1984). Ous planctònics lliures d'*H. dactylopterus* foren detectats per Marinaro (1968) i Brownell (1979); i, més recentment, Wourms i Lombardi (1992) suggerien finalment que l'espècie presenta estadis de transició entre l'oviparisme i el viviparisme, fet que després s'ha confirmat amb els treballs de White *et al.*, (1998), Muñoz *et al.* (1999; 2000) i Zerouali-Khodja *et al.* (2006).

En definitiva, tot i que al llarg dels anys el patró de reproducció d'*H. dactylopterus* ha estat llargament discutit per diversos investigadors, actualment és irrefutable que el penegal és una espècie zigópara, estratègia reproductiva que certament situaria aquesta espècie entremig d'una hipotètica línia evolutiva entre l'oviparisme d'*Scorpaena* i el viviparisme de *Sebastes*.

*Si centrem l'anàlisi en l'estructura ovàrica que presenta *Helicolenus*, aquest caràcter el situa més a prop del gènere ovípar *Scorpaena* que no del gènere vivípar *Sebastes*.

Els ovaris dels teleostis es divideixen generalment en els tipus gimnovàric i cistovàric (Hoar, 1957), i aquest últim es subdivideix en 4 tipus segons característiques histològiques (Takano, 1989). Es podria dir que la majoria d'espècies que pertanyen a la mateixa família presenten el mateix tipus d'ovari. Ara bé, en la família Scorpaenidae es detecten dues variacions a les que Takano (1989) anomenà: ovari cistovàric tipus II-3 al tipus amb estroma central, en el que el parènquima es desenvolupa radialment entorn el sistema circulatori sanguini tot travessant centralment l'ovari, i ovari cistovàric II-1 al tipus amb lamel·les dorsals, en el que el parènquima es desenvolupa des de la paret dorsal de l'ovari i la cavitat ovàrica es localitza a la part ventral de la gònada. L'ovari amb l'estroma central només ha estat observat en el grup dels escorpènids (Orton, 1955; Krefft, 1961; Sánchez i Acha, 1988; Koya *et al.*, 1995a; White *et al.*, 1998; Muñoz *et al.*, 1999; Yoneda, 2000; Muñoz *et al.*, 2002d) amb la única excepció de dues espècies de la família Caracanthidae, escorpeniformes que podrien estar

estretament relacionats amb ells (Cole, 2003). Per altra banda, l'ovari amb lamel·les dorsals apareix de manera general en diverses famílies de teleostis (com els clupeidae, *Clupea pallassii*, Yamamoto, 1955; gasterosteidae, *Pungitius tymensis*, Yamamoto, 1963; gobiidae, *Chaenogobius isaza*, Takahashi, 1981; cichlidae, *Oerochromis niloticus*, Takano, 1987; entre d'altres).

En aquest sentit, Koya i Muñoz (2007) analitzaren l'estructura ovàrica de sis gèneres de la família Scorpaenidae i altres famílies d'Escorpeniformes, i trobaren que el tipus d'ovari més comú, amb lamel·les dorsals, no apareix mai en els gèneres *Scorpaena* ni *Helicolenus*, sinó que només el presenten els gèneres escorpènids vivípars (*Sebastes* i *Sebasticus*).

Segons aquest estudi, l'ovari amb lamel·les dorsals seria l'estructura ovàrica bàsica dels escorpènids, mentre que l'ovari amb estroma central seria una estructura derivada només en aquest grup de peixos. Els escorpènids procedirien d'un ancestre amb fertilització externa i ovaris amb lamel·les dorsals, del que n'hauria sorgit per una banda una espècie que adquirí el comportament de copular i que es diferencià en espècies vivípare com *Sebasticus* o *Sebastes*; i per altra banda les espècies d'escorpènids que actualment realitzen una posta d'ous pelàgica, els quals haurien modificat l'estructura ovàrica per la que els permetria formar la massa d'ous gelatinosa. Aquestes serien les espècies d'escorpènids ovípars amb l'estroma central, com les del gènere *Scorpaena*, a partir de les quals haurien evolucionat les que representen un pas cap a la viviparitat com el gènere *Helicolenus*.

Un punt que no recolza aquesta hipòtesi és el destacat per Wourms (1991) i Wourms i Lombardi (1992), els quals proposaren la hipòtesi que *Sebastes* podria provenir d'una evolució des d'*Helicolenus* quan observaren que a l'interior dels ovaris de *Sebastes* existia un fluid ovàric gelatinós. No obstant existeixen clares diferències funcionals en els dos tipus de fluid gelatinós: mentre que en *Helicolenus* la massa engloba els ous i conforma la posta, en *Sebastes* el material gelatinós es troba al centre de la massa d'ous i sembla que juga un paper en mantenir els embrions prop del sistema circulatori. De manera que l'existència d'una massa gelatinosa en ambdós gèneres no sembla ser raó suficient per

postular una possible evolució des d'*Helicolenus* fins a *Sebastes* (Koya i Muñoz, 2007).

Així doncs, tot i que si ens fixem amb el mode reproductiu semblaria que *Sebastes* seria el gènere més evolucionat dins la hipotètica línia evolutiva entre *Scorpaena*, *Helicolenus* i *Sebastes*, l'anàlisi de l'estructura ovàrica ens diferencia dues línies a partir d'un ancestre comú: *Scorpaena* i *Helicolenus* per una banda (amb una clara evolució envers la viviparitat dins el mateix grup) i *Sebastes* i la resta de gèneres escorpènids vivípars per l'altra.

*Diversos estudis han recalcat la potencial aplicació de la morfologia espermàtica en l'estudi de les relacions filogenètiques en diferents grups animals (Healy, 1988; Jamieson, 1991;2009; Justine, 1995; Gwo *et al.*, 2004, 2005).

L'espermàtida d'*Helicolenus* és similar a la de *Sebastes*, malgrat que en el penegal aquestes cèl·lules sexuals tenen forma d'"U", i en *Sebastes* presenten forma de falç. Pel que fa al tipus d'espermatozoide dels gèneres que comparem, *Scorpaena*, que duu a terme fecundació externa, presenta el tipus anacrosòmic aquasperm tipus I amb el cap arrodonit. En canvi, en *Helicolenus* i *Sebastes* el tipus d'espermatozoide és l'anacrosòmic introsperm, típic d'espècies amb fecundació interna. En l'apartat corresponent a la discussió sobre els mascles ja s'han argumentat les causes d'aquestes diferències.

En referència a la peça mitja, en *Scorpaena* hi trobem 2-3 fileres amb 8-9 mitocondris cada una, mentre que en *Helicolenus* i en *Sebastes thompsoni* (Lee *et al.*, 1997) conté de 4 a 5 capes de mitocondris amb de 8 a 10 mitocondris a cada una. Per tant la quantitat total de mitocondris és també similar entre els 2 gèneres amb fecundació interna.

Així doncs, basant-nos en la morfologia espermàtica dels tres gèneres, només podem afirmar que les espermàtides i els espermatozoides són més similars entre els gèneres *Helicolenus* i *Sebastes* que no els de *Scorpaena*. Ara bé, cal tenir present que es tracta de característiques íntimament lligades al tipus de

fecundació i que apareixen de forma general en moltes espècies que no tenen cap mena de parentesc sinó que comparteixen una mateixa estratègia reproductiva. En aquest sentit, creiem que les diferències estan causades pel fet que *Scorpaena* presenta fecundació externa, mentre que els altres dos gèneres tenen fecundació interna.

*Un altre aspecte que podria tenir la seva significació és el procés d'hidratació dels ous. La hidratació es defineix com la incorporació d'aigua per part de l'oòcit durant la maduració meiòtica, i és la principal causa de l'augment de volum d'aquest. En els ous pelàgics, que contenen grans quantitats d'aigua (pot arribar a constituir el 90-95% del pes) i una flotabilitat positiva en la columna, aquest fet facilita tant l'aport d'oxigen a l'embrió com la seva dispersió pel medi marí (Cerdà, 2002). En *Scorpaena*, gènere estrictament ovípar, existeix i és necessària la hidratació dels ous per tal de conferir-los flotabilitat en el medi marí. En el cas d'*Helicolenus* la hidratació podria també estar relacionada amb la flotació, en aquest cas, dels embrions en el medi marí, malgrat que si existeix fecundació interna i manteniment dels embrions dins el cos matern, la hidratació dels ous no té massa sentit fisiològic.

En el cas del gènere *Sebastes*, degut al seu viviparisme el fenomen de la hidratació no existeix, i la maduració dels ous només s'intueix per la pèrdua d'integritat del nucli, la coalescència dels grànuls de vitel i el despreniment de l'ou del fol·licle (Saborido-Rey, 1994). Així doncs, la hidratació dels ous del penegal pot estar relacionada amb la seva flotabilitat un cop alliberats, però també pot ser un tret dels escorpènids ovípars com *Scorpaena* que s'ha mantingut.

*Pel que fa a la velocitat del desenvolupament embrionari també hi ha diferències dignes de ser mencionades. Si es compara el desenvolupament d'un escorpènid ovípar com *Sebastolobus*, en el que Pearcy (1962) observà embrions amb somites i lents als ulls 2 dies després de començar la incubació a 10°C, amb el d'un altre

escorpènid vivípar com *Sebastes flavidus*, pel qual Bowers (1992) va descriure que la formació de somites començava al cap d'11 dies, destaca un desenvolupament embrionari molt més ràpid pel gènere ovípar. En aquest sentit també Wourms (1991) apunta que el període de desenvolupament embrionari dels ous de *Sebastes* (gènere vivípar) sembla ser 5-10 dies més llarg quan es compara amb la taxa de desenvolupament dels peixos escorpeniformes ovípars.

Basant-nos en el treball de Sánchez i Acha (1988) citat anteriorment, hem pogut concloure que el desenvolupament dels embrions del penegal sembla ser més ràpid que l'enregistrat per espècies vivípare de la mateixa família. Per tant, tal i com s'ha discutit en l'apartat de la tesi corresponent, segons la velocitat del desenvolupament embrionari *H. dactylopterus* estaria més proper als gèneres d'escorpènids ovípars que no dels vivípars.

D'aquest seguit de caràcters exposats en el present treball, i que es poden relacionar amb la posició filogenètica del penegal, se'n dedueix que, tot i que el viviparisme de *Sebastes* semblaria el mode reproductiu més evolucionat i derivat de l'oviparisme a través d'un pas intermedi com el zigoparisme que presenta *Helicolenus*, existeixen algunes raons contràries a aquesta afirmació. Creiem que el pes de les similituds en l'estructura ovàrica i la velocitat de desenvolupament embrionari, entre d'altres, recolzen una estreta relació entre el penegal i els gènere d'escorpènids ovípars, allunyant-lo filogenèticament del gènere vivípar *Sebastes*.

Com a síntesi final volem remarcar que les diverses peculiaritats reproductives del penegal, que hem presentat i discutit en aquest treball, la fan una espècie realment interessant des del punt de vista de la biologia de la reproducció i tot el que aquesta comporta per l'estratègia vital de l'espècie. Evidentment, queden encara moltes qüestions per resoldre que evidencien l'encant de la carrera

investigadora, reflexat en una cita que diu: “ El més important és no deixar mai de fer-se preguntes” (Albert Einstein).

5. CONCLUSIONS

5. CONCLUSIONS:

Helicolenus dactylopterus és una espècie que presenta un oviparisme zigòpar i mostra característiques reproductives molt peculiars:

- La maduració sexual de mascles i femelles no coincideix en el temps, els mascles tenen petites quantitats d'espermatozoides a partir del mes de juliol i les femelles no tenen ous madurs fins a finals d'any. Aquest desfasament temporal es pot relacionar amb la necessitat d'emmagatzemar l'esperma.
- Els espermatozoides desenvolupen una massa citoplasmàtica entorn els seus caps quan es troben acumulats al conducte espermàtic testicular, a punt per a ser inseminats al cos de la femella.
- Un cop dins l'ovari els espermatozoides són capturats i englobats per cèl·lules de l'epiteli lamel·lar que es divideixen i es diferencien, formant criptes especialitzades en l'emmagatzematge de les cèl·lules sexuals masculines fins al moment de la fertilització.
- La nutrició dels espermatozoides emmagatzemats pot donar-se per dues vies: a partir del material glucídic de l'interior de la bossa citoplasmàtica que tenen els propis espermatozoides, i a través de secrecions de material nutritiu per part de l'epiteli criptal cap a dins l'espai on hi ha les cèl·lules sexuals masculines emmagatzemades.
- Existeixen fermes unions desmosòmiques entre les cèl·lules criptals per tal d'aïllar els espermatozoides tant de possibles agressions externes com del propi sistema immunitari de la femella durant tot el període d'emmagatzematge. Quan passa el període de posta les unions intercel·lulars es trenquen permetent el pas de fagòcits que eliminaran els espermatozoides residuals que poden quedar encara dins d'alguna de les criptes.

- El penegal realitza postes múltiples i allibera embrions en desenvolupament englobats en una matriu gelatinosa produïda per les cèl·lules de l'epiteli ovàric i lamel·lar. Els embrions es troben en estadis primerencs de desenvolupament, que s'assoleixen en dos o com a màxim tres dies des del moment de la fertilització.
- La posició filogenètica del gènere *Helicolenus* es troba actualment en discussió. El mode reproductiu del penegal suggereix que pot representar un pas evolutiu intermedi entre els gèneres *Scorpaena* (ovípar) i *Sebastes* (vivípar), hipòtesi que porta a incloure'l habitualment en el grup majoritàriament vivípar dels sebàstids. Ara bé, cal destacar que altres trets relacionats amb la reproducció, com el tipus d'ovari o la velocitat de desenvolupament embrionari, l'apropen més als gèneres ovípars dels escorpènids.

6. BIBLIOGRAFIA

BIBLIOGRAFIA:

- Aboim, M.A., Rogers, A.D., Menezes, G.M., Maggioni, R., Pearson, C.V.M. 2003.** Isolation of polymorphic microsatellite markers for the demersal fish *Helicolenus dactylopterus* (Dela Roche, 1809). *Molecular Ecology Notes*, **3**:18-20.
- Aboim, M.A., Menezes, G.M., Schlitt, T., Rogers, A.D., 2005.** Genetic structure and history of populations of the deep-sea fish *Helicolenus dactylopterus* (Delaroche, 1809) inferred from mtDNA sequence analysis. *Molecular Ecology*, **14**:1343-1354.
- Abraham, M., Rahamin, E., Tibika, H., Golenser, E. 1980.** The blood-testis barrier in *Aphanius dispar* (Teleostei). *Cell Tissue Research*, **211**:207-214.
- Ahammad, M. M., Bhattacharyya, D., Jana, B. B. 2002.** The hatching of common carp (*Cyprinus carpio* L.) embryos in response to exposure to different concentrations of cryoprotectant at low temperatures. *Cryobiology*, Vol **44**(2):114-121.
- Alberts, B., Bray D., Lewis J., Raff M., Roberts K., Watson J.D., 1996.** Tráfico vesicular mediante las rutas secretora y endocítica. *Biología molecular de la célula*. 3a edición. Capítulo **13**, 642-692 pp.
- Alderdice, D.F., Jensen, J.O.T., Velsen, F.P.J. 1984.** Measurement of hydrostatic pressure in salmonid eggs. *Canadian Journal of Zoology*, **62**:1977-1987.
- Allain, V., Lorange, P. 2000.** Age estimation and growth of some deep-sea fish from the northeast Atlantic Ocean. *Cybium*, **24**(3) suppl.:7-16.
- Allain, V. 2001.** Reproductive strategies of three deep-water benthopelagic fishes from the northeast Atlantic Ocean. *Fisheries Research*, **51**:165-176.
- Anderson, M. 1994.** *Sexual Selection*. Princeton University Press, Princeton.
- Arezo, M.J., Pereiro, L., Berois, N. 2005.** Early development in the annual fish *Cynolebias viarius*. *Journal of Fish Biology*, **66**:1357-1370.
- Atwood, D.L., Chia, F.S. 1974.** Fine structure of an unusual spermatozoon of a brooding sea cucumber, *Cucumaria lubrica*. *Canadian Journal of Zoology*, **52**:519-523.

- Baccetti, B. (ed.). 1970.** Comparative spermatology. New York: Academic Press.
- Baccetti, B. (ed.). 1991.** Comparative spermatology 20 years after. New York: Raven Press.
- Barsukov, V.V. 1979.** Subspecies of the Atlantic blackbelly rosefish, *Helicolenus dactylopterus* (Dela Roche, 1809). *Journal of Ichthyology*, **19**:1-17.
- Barsukov, V.V. 1981.** A brief review of the subfamily *Sebastinae*. *Journal of Ichthyology*, **21**:1-26.
- Bauchot, M.L. 1987.** Scorpaenidae. In: Fisher, W., Bauchot, M.L., Schneider, M. (eds), Fiches FAO d'identification des espèces pour les besoins de la pêche (Revisión 1). Méditerranée et mer Noire. Zone de pêche 37, vol.2. FAO, Rome, pp.1290-1300.
- Bergmann, M., Schindelmeiser, J., Greven, H. 1984.** The blood-testis barrier in vertebrates having different testicular organization. *Cell Tissue Research*, **238**:145-150.
- Billard, R. 1970.** La spermatogenèse de *Poecilia reticulata*, IV. La spermiogenèse. Étude ultrastructurale. *Annales de Biologie Animale*, **10**:493-510.
- Billard, R. 1983.** Spermiogenesis in the rainbow trout (*Salmo gairdneri*): An ultrastructural study. *Cell and Tissue Research*, **233**:265-284.
- Billard, R. 1984.** Ultrastructural changes in the spermatogonia and spermatocytes of *Poecilia reticulata* during spermatogenesis. *Cell and Tissue Research*, **237**:219-226.
- Birkhead, T.R., Moller, A.P. 1988.** Sperm competition, Sexual Selection and Different Routes to Fitness. In: *Sperm Competition and Sexual Selection*. Birkhead, T.R. i Moller, A.P. (eds). Cambridge University Press. pp.757-777.
- Bister, T.J., Willis, D.W., Brown, M.L., Jordan, S., Neumann, R.M., Quist, M.C., Guy, C.S. 2000.** Proposed standard weight (W_s) equations and standard length categories for 18 warmwater nongame and riverine fish species. *North American Journal of Fisheries Management*, **20**:570–4.
- Blackburn, D.G. 1982.** Classification of the reproductive modes of vertebrates. *American Zoologist*, **22**:910.
- Blaxter, J.H.S., Hempel, G. 1966.** Utilization of yolk by herring larvae. *Journal of Marine Biological Association of the United Kingdom*, **46**:219-234.

- Blazer, V.S. 2002.** Histopathological assessment of gonadal tissue in wild fishes. *Fish Physiology and Biochemistry*, **26**:85-101.
- Boehlert, G.W., Yoklavich, M.M. 1984.** Reproduction, embryonic energetics and maternal fetal relationship in the viviparous genus *Sebastes* (Pisces: Scorpaenidae). *Biological Bulletin*, **167**:354-370.
- Boehlert, G.W., Kusakari, M., Shimizu, M., Yamada, M. 1986.** Energetics during embryonic development in kurosoi, *Sebastes schlegeli*. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, **101**:239-256.
- Bolger, T., Connolly, P.L. 1989.** The selection of suitable indices for the measurement and analysis of fish condition. *Journal of Fish Biology*, **34**:(2)171–82.
- Bonet, S, Molinas, M. 1983.** Utilitat del glicol metacrilat en l'obtenció de talls semifins per a histologia. *Annals de la Secció de Ciències del Col·legi Universitari de Girona (UAB)*, **9**:21-29.
- Boutière, H. 1950.** Les Scorpaenidés des eaux marocaines. *Travaux de l'Institut Scientifique Chérifien, Série Zoologie*, **15**:83 p.
- Boutière, H. 1958.** Les Scorpénidés des eaux marocaines. *Travaux de l'Institut Scientifique Chérifien, Série Zoologie*, **15**:84 p.
- Bowers, M.J. 1992.** Annual reproductive cycle of oocytes and embryos of yellowtail rockfish *Sebastes flavidus* (Family Scorpaenidae). *Fishery Bulletin*, **90**:231-242.
- Brown, J.L. 1997.** A theory of mate choice based on heterozygosity. *Behavioural Ecology*, **8**:60-65.
- Brownell, C.L. 1979.** Stages in early development of 40 marine fish species with pelagic eggs from the Cape of Good Hope. *Ichthyological Bulletin J.L.B. Smith Institute*, **40**:84.
- Brummett, A.R., Dumont, J.N., Larkin, J.R., 1982.** The ovary of *Fundulus heteroclitus*. *Journal of Morphology*, **173**: 1-16.
- Burns, J.R., Weitzman, S.H., Grier, H.J., Menezes, N.A. 1995.** Internal fertilization, testis and sperm morphology in glandulocaudine fishes (Teleostei:Characidae:Glandulocaudinae). *Journal of Morphology*, **224**:131-145.
- Burns, J.R., Weitzman, S.H., Malabarba, L.R. 1997.** Insemination in eight species of cherodontine fishes (Teleostei:Characidae:Cherodontinae). *Copeia*, **1997**:433-438.

- Burns, J.R., Weitzman, S.H. 2004.** Insemination in ostariophysan fishes. *Proceedings of the Second International Symposium of Livebearing Fishes*, Querétaro, Mexico.
- Burns, J.R., Weitzman, S.H. 2005.** Insemination in ostariophysan fishes. In H.J. Grier I M.C. Uribe (eds), *Viviparous Fishes*. New Life Publications, Homestead, Fl.pp. 107-134.
- Byun, S.G., Go, C.S., Moon, Y.B. 1995.** Egg development and morphology of larvae of the oblong rockfish, *Sebastes oblongus*. *Bulletin of the National Fisheries and Research Development Agency of Korea*, **50**:31-39.
- Carcador, F., Pestana, G. 1995.** Abundance and distribution pattern of bluemouth (*Helicolenus dactylopterus*) in the Portuguese continental waters (ICES, Div.IXa). ICES Doc C.M. 1995/G. pp. 19-22.
- Cerdà, J. 2002.** Mecanismos fisiológicos durante la hidratación del huevo de teleósteos: hacia el desarrollo de nuevos métodos de criopreservación. *Boletín Instituto Español de Oceanografía*, **18** (1-4):145-152.
- Clark, A.W. 1967.** Some aspects of spermiogenesis in a lizard. *American Journal of Anatomy*, **121**:369-400.
- Cole, K.S. 2003.** Hermaphroditic characteristics of gonad morphology and inferences regarding reproductive biology in *Caracanthus* (Teleostei, Scorpaeniformes). *Copeia*, **2003**(1):68-80.
- Crupkin, M., Montecchia, C.L., Trucco, R.E. 1988.** Seasonal variations in gonadosomatic index, liversomatic index and myosin/actin ratio in actomyosin of mature hake (*Merluccius hubbsi*). *Comparative Biochemistry and Physiology*, **89A**:7-10.
- Cushing, D.H. 1976.** Biology of fishes in the pelagic community. In:Cushing, D.H., Walsh, J.J. (eds.) *The ecology of the seas*. Blackwell Oxford, pp. 317-340.
- DARP. 2004.** Departament d'Agricultura, Ramaderia i Pesca, Captures Pesqueres ([Http://www.gencat.net/darp/c/pescamar/captures/cestca06.htm](http://www.gencat.net/darp/c/pescamar/captures/cestca06.htm)). Accessed October 2003.
- DARP. 2008.** Departament d'Agricultura, Ramaderia i Pesca. Captures Pesqueres:http://www20.gencat.cat/docs/DAR/PE_Pesca_aquicultura/PE09_Captures_pesqueres/Documents/Fitxers_estatics/2008Captures_especies_port.xls .

- Darwin, C. 1871.** *The Descent of Man, an Selection in Relation to Sex*. John Murray, London.
- Davenport, J.S., Lonning, S., Kjorsvik, E. 1981.** Osmotic and structural changes during early development of eggs and larvae of the cod, *Gadus morhua*.L. *Journal of Fish Biology*, **19**:317-331.
- DelaRoche, F.E., 1809.** Suite du mémoire sur les espèces de poissons observées à Iviça. Observations sur quelques-uns des poissons indiqués dans le precedent tableau et descriptions des espèces nouvelles ou peu connues. *Annales Muséum National D'Histoire Naturelle*.Paris, v.**13**:313-361.
- De Vlaming, V.L. 1974.** Environmental and endocrine control of teleost reproduction. In C.B. Schreck (ed.), *Control of Sex in Fishes*. Sea Grant, Extension Division, Virginia Polytechnic Institute and State University, Blacksburg, VA, USA. pp. 13-83.
- Dieuzeide, R. Novella, M., Roland, J. 1955.** Catalogue des poissons des côtes algérienes. III. Ostéoptérygiens (suite et fin). *Bulletin des Travaux publiés par la Station d'Aquiculture et de Pêche de Castiglione*, **6**:384p.
- Domeneghini, C., Arrighi, S., Radaelli, G., Bosi, G., Veggetti, A. 2005.** Histochemical analysis of glycoconjugate secretion in the alimentary canal of *Anguilla anguilla* L. *Acta Histochemica*, **106**:477-487.
- D'Onghia, G., Mastrotaro, F., Panza, M. 1996.** On the growth of rockfish, *Helicolenus dactylopterus* (Delaroche, 1809), from the Ionian Sea. *FAO Fisheries Report*, **533**:143-152.
- Dym, M., Fawcett, D.W. 1970.** The blood-testis barrier in the rat and the physiological compartmentation of the seminiferous epithelium. *Biology Reproduction*, **3**:308-326.
- Dym, M., Cavicchia, J. 1979.** Further observations on the blood-testis barrier in monkeys. *Biology Reproduction*, **17**:390-403.
- Dziuk, P.J. 1996.** Factors that influence the proportion offspring sired by a male following heterospermic insemination. *Animal Reproduction Science*, **43**:65-88.
- Eberhard, W.G. 1996.** *Female Control: Sexual Selection by Cryptic Female Choice*. Princeton University Press, Princeton.
- Echeverria, T.W. 1987.** Thirty-four species of California rockfishes: maturity and seasonality of reproduction. *Fishery Bulletin*, **85**:229-250.

- Erickson, D.L., Pikitch, E.K. 1993.** A histological description of shortspine thornyhead, *Sebastolobus alascanus*, ovaries: structures associated with the production of gelatinous egg masses. *Environmental Biology of Fishes*, **36**:273-282.
- Eschmeyer, W.N. 1969.** A systematic review of the scorpionfishes of the Atlantic Ocean (Pisces: Scorpaenidae). *Occasional papers of the Californian Academy of Sciences*, **79**:130pp.
- Eschmeyer, W.N., Hureau, J.C. 1971.** *Sebastes mouchezi*, a senior synonym of *Helicolenus tristanensis*, with comments on *Sebastes capensis* and zoogeographical considerations. *Copeia*, **1971**(3): 576-579.
- Eschmeyer, W.N., Dempster, L.J. 1990.** Scorpaenidae. In: Quero, J.C., Hureau, J.C., Karrer, C., Post, A., Saldanha, L. (Eds.), Check-list of the eastern tropical Atlantic (CLOFETA), vol.2. UNESCO, pp.665-666.
- Esteves, E., Aníbal, A., Krug, H., Marques da Silva, H. 1997.** Aspects of age and growth of bluemouth, *Helicolenus dactylopterus dactylopterus* (Delaroche, 1809) from the Azores. *Life and Marine Sciences*, **15A**:83-95. Ponta Delgada. ISSN 0873-4704.
- Fawcett, D.W. 1970.** A comparative view of sperm ultrastructure. *Biological Reproduction Supplement*, **2**:90-127.
- Fawcett, D.W., Anderson, W.A., Phillips, D.M. 1971.** Morphogenetic factors influencing the shape of the sperm head. *Developmental Biology*, **26**:220-251.
- Figuereido, M.J., Figuereido, I., Moura, O. 1995.** Distribution, abundance and size of Blackbelly rosefish (*Helicolenus dactylopterus*) and Mediterranean redfish (*Hoplostethus mediterraneus*) on the slope of the Portuguese South and Southern West Coasts. International Council for the Exploration of the Sea, G:10-2.
- Fishelson, L. 1977.** Ultrastructure of the epithelium from the ovary wall of *Dendrochirus brachypterus* (Pteroidae, Teleostei). *Cell & Tissue Research*, **177**:375-380.
- Fishelson, L., Gibson, R.N., Delarea, Y. 1990.** Unusual cell organelles during spermiogenesis in two species of gobies (Gobiidae, Teleostei). *Cell Tissue Research*, **262**:397-400.

- Fishelson, L. 2003.** Comparison of testes structure, spermatogenesis, and spermatocytogenesis in young, aging, and hybrid cichlid fish (Cichlidae, Teleostei). *Journal of Morphology*, **256**:285-300.
- Foley, J.E., Dietrich, D.R., Swenberg, J.A., Maronpot, R.R. 1991.** Detection and evaluation of proliferating cell nuclear antigen (PCNA) in rat tissue by an improved immunohistochemical procedure. *Journal of Histotechnology*, **14**:237-241.
- Fordham, S.E., Trippel, E.A. 1999.** Feeding behaviour of cod (*Gadus morhua*) in relation to spawning. *Journal of Applied Ichthyology*, **15**:1-9.
- França de, L.R., Ogawa, T., Avarbock, M.R., Brinster, R.L., Russell, L.D. 1998.** Germ cell genotype controls cell cycle during spermatogenesis in the rat. *Biology Reproduction*, **59**:1371-1377.
- Frogliia, C. 1976.** Observations of the feeding of *Helicolenus dactylopterus* (DelaRoche). *Rapports et Procès-verbaux des Réunions Conseil International pour l'Exploration de la Mer Mediterranee*, Monaco, **23** (8):47-48.
- Frost, W.E., Kipling, C. 1967.** A study of reproduction, early life, length-weight relationship and growth of pike, *Esox lucius* L., in Windermere. *Journal of Animal Ecology*, **36**:651–693.
- Fujita, S. 1958.** On the egg development and larval stages of a viviparous scorpaenid fish, *Sebastes oblongus* Günther. *Bulletin Japanese Society Scientific Fisheries*, **24**:475-479.
- Fujita, S. 1959.** On the egg development of a viviparous scorpaenid fish. *Sebastes pachycephalus nigricans* (Schmidt). *Journal of Japanese Association of Zoological Gardens and Aquariums*, **1**:42-43. (In Japanese).
- Fujita, H., Kohda, M. 1996.** Male mating effort in the viviparous scorpionfish, *Sebasticus marmoratus*. *Ichthyological Research*, **43**(3):247-255.
- Fukataki, H. 1963.** Pellagic egg balloons from the Western North Pacific referable to *Sebastolobus macrochir* (Günther). *Bulletin of the Japan Sea Regional Fisheries Research Laboratory*, **11**: 91-100.
- Fulton, TW. 1904.** The rate of growth of fishes. *Fish Board of Scotland Annual Report*, **22**:141–241.
- Gaertner, J.C., Mazouni, N., Sabatier, R., Mollet, B. 1999.** Spatial structure and habitat associations of demersal assemblages in the Gulf of Lions: a multicompartmental approach. *Marine Biology*, **135**:199-208.

- Gardiner, D.M. 1978.** Cyclic changes in fine structure of the epithelium lining the ovary of the viviparous teleost, *Cymatogaster aggregata* (Perciformes: Embiotocidae). *Journal of Morphology*, **156**:367-380.
- Ginsburg, A.S. 1963.** Sperm-egg association and its relationship to the activation of the egg in salmonid fishes. *Journal of Embryology and Experimental Morphology*, **11**(1):13-33.
- Ginzburg, A.S. 1968.** Fertilization in fishes and the problem of polyspermy. Moscow: Acad. Sci. USSR.
- Golovan', G.A., Pakhorukov, N.P., Tikhorikov, V.B. 1991.** Morphoecological characterization of rosefish, *Helicolenus lengerichi* (Scorpaenidae) from the Nasca Ridge. *Journal of Ichthyology*, **31**:117-128.
- Graham, D.H. 1939.** Breeding habits of the fishes of Otago harbor and adjacent seas. *Transactions Proceeding of the Royal Society of New Zealand*, **69**:361-372.
- Graham, D.H. 1956.** *A Treasury of New Zealand Fishes*. Wellington: A.H. i A.W. Reed.
- Grier, H.J. 1973.** Ultrastructure of the testis in the teleost *Poecilia latipinna*. Spermiogenesis with reference to the intercentriolar lamellated body. *Journal of Ultrastructural Research*, **45**:82-92.
- Grier, H.J. 1975.** Spermiogenesis in the teleost *Gambusia affinis* with particular reference to the role played by microtubules. *Cell & Tissue Research*, **165**:89-102.
- Grier, H.J. 1993.** Comparative organisation of Sertoli cells including the Sertoli cells barrier. In: Russel L.D. Griswold M.D (eds) *The Sertoli Cells*. Cache River Press. Clearwater, F.L. pp 703-739.
- Grier, H.J. 2000.** Ovarian germinal epithelium: its dual role in establishing male reproductive classes and understanding the basis for indeterminate egg production in female fishes. pp. 537-552. In Creswell, R.L. (ed.), *Proceedings of the Fifty-third Annual Gulf and Caribbean Fisheries Institute, November 2000*. Mississippi/Alabama Sea Grant Consortium, Fort Pierce, Florida.
- Grier, H.J., Uribe, M.C., Parenti, L.R., De la Rosa-Cruz, G. 2005.** Fecundity, the germinal epithelium, and folliculogenesis in viviparous fishes. Pp 191-126. In M.C Uribe and H.J. Grier (eds), *Viviparous Fishes*. New Life Publications Homestead, FL, USA.

- Grieswold, M.D., Russell, L.D. 1999.** Sertoli cells, function. In: Knobil, E., Neil, J.D., editors. Encyclopedia of reproduction IV. New York: Academic Press. pp. 371-380.
- Gunderson, D.R. 1997.** Trade-off between reproductive effort and adult survival in oviparous and viviparous fishes. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, **54**:990-998.
- Gwo, J.-C., Yang, W.-T., Kuo, M.-C., Takemura, A., Cheng, H.-Y. 2004.** Spermatozoal ultrastructures of two marine perciform teleost fishes, the goatfish, *Paraupeneus spilurus* (Mullidae) and the rabbitfish, *Siganus fuscescens* (Siganidae) from Taiwan. *Tissue & Cell*, **36**(1):63-69.
- Gwo, J.C, Chiu, J.Y., Lin, C.Y., Su, Y., Yu, S.L. 2005.** Spermatozoal ultrastructure of four Sparidae fishes: *Acanthopagrus berda*, *Acanthopagrus australis*, *Lagodon rhomboids* and *Archosargus probatocephus*. *Tissue & Cell*, **37**(2):109-15.
- Hagedorn M., Kleinhans, F. W., Wildt D. E., Rall W. F. 1997.** Chill sensitivity and cryoprotectant permeability of dechorionated zebrafish embryos, *Brachydanio rerio*. *Cryobiology*, vol.34 (**3**):251-263.
- Haigh, E.H. 1972.** Larval development of three species of economically important South African fishes. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, **54**:47-70.
- Hall, P.A., Levison, D.A., Woods, A.L., Yu, C.C.-W., Kellock, D.B., Watkins, J.A., Barnes, D.M., Gillet, C.E., Camplejohn, R., Dover, R., Waseem, N.H., Lane, D.P. 1990.** Proliferation cell nuclear antigen (PCNA) immunolocalization in paraffin sections: an index of cell proliferation with evidence of deregulated expression in some neoplasms. *The Journal of Pathology*, **162**:285-294.
- Hamlett, W.C. 2002.** Introduction. *Journal of Experimental Zoology*, **292**:109-110.
- Hamlett, W.C., Musick, J.A., Hysell, CK., Sever, D.M. 2002.** Uterine epithelial-sperm interaction, endometrial cycle and sperm storage in the terminal zone of the oviducal gland in the placental smoothhound, *Mustelus canis*. *Journal of Experimental Zoology*, **292**:129-144.
- Hardy, M.P., Dent, J.M. 1986.** Regulation of motility in sperm of red-spotted newt. *Journal of Experimental Zoology*, **240**:385-396.

- Hayakawa, Y., Munehara, H. 2004.** Ultrastructural observations of euspermatozoa and paraspermatozoa in a copulatory cottoid fish *Blepsias cirrhosus*. *Journal of Fish Biology*, **64**:1530-1539.
- Hayashi, S. 1990.** Studies of the ultrastructural changes of ovarian tissue with oogenesis and pregnancy in white-edged rockfish, *Sebastes taczanowskii*. Master's Thesis, Hokkaido University, Hakodate. pp.39. (in Japanese).
- Healy, J.M. 1988.** Sperm morphology and its systematic importance in the Gastropoda. *Malacological Review*, **4**:251-266.
- Heessen, H.J.L., Hislop, J.R.G., Boon, T.W. 1996.** An invasion of the North Sea by blue-mouth, *Helicolenus dactylopterus* (Pisces:Scorpaenidae). *ICES Journal of Marine Science*, **53**:874-877.
- Heming, T.A., Biddington, R.K. 1988.** Yolk absorption in embryonic and larval fishes. pp 407-446. In: W.S. Hoar and D.J. Randall (ed.) *Fish physiology*. Vol. XIA. The physiology of developing fish. Academic Press, San Diego, CA.
- Hoar, W.S. 1957.** The gonads and reproduction. In: Brown, M.E. (ed.), *The Physiology of Fishes, Vol.1*, Academic Press, New York, pp. 287-321.
- Hoar, W.S. 1969.** Reproduction. In *Fish physiology*, vol.III (ed. W.S. Hoar and D.J. Randall), pp. 1-72. New York: Academic Press.
- Hoffman, R., Wondrak, P., Groth, W. 1980.** Seasonal anatomical variation in the testes of European pike, *Esox lucius* L. *Journal of Fish Biology*, **16**:457-482.
- Hoffmann, H. 1982.** The food of three grenadiers, rosy soldier fish, and bluemouth from the North-West African slope. *Rapports et Procès-verbaux des Réunions Conseil International pour l'Exploration de la Mer*, **180**:374-378.
- Holm, L., Ridderstråle, Y. 2002.** Development of sperm storage tubules in the quail during sexual maturation. *Journal of Experimental Zoology*, **292**:200-205.
- Hureau, J.C., Litvinenko, N.I. 1986.** Scorpaenidae: In: Whitehead, P.J.P., Bauchot, M.L., Hureau, J.C., Nielsen, J., Tortonese, E. (Eds.), *Fishes of the north-eastern Atlantic and the Mediterranean*, vol.3. UNESCO, Paris. pp.1211-1229.
- Hussey, N.E., Cocks, D.T., Dudley, S.F.J., McCarthy, I.D., Wintner, S.P. 2009.** The condition conundrum: application of multiple condition indices to the dusky shark *Carcharhinus obscurus*. *Marine Ecology Progress Series*, **380**:199-212.

- ICES. 2005.** Report of the Working Group on the Biology and Assessment of Deep Sea Fisheries Resources. ICES CM 2005/ACFM:07 Ref.D,G.
- Iglésias, S.P. 2009.** Actinopterygians from the North-eastern Atlantic and the Mediterranean (A natural classification based on collection specimens) Volume I (plates) Provisional version 05. France.
- Imamura, H. 1996.** Phylogeny of the family Platycephalidae and related taxa (Pisces: Scorpaeniformes). *Species Divers*, **1**: 123-233.
- Imamura, H. 2004.** Phylogenetic relationships and new classification of the superfamily Scorpaenoidea (Actinopterygii: Perciformes). *Species Divers*, **9**:1-36.
- Ishida, M. 1994.** Phylogeny of the suborder Scorpaenoidei (Pisces: Scorpaeniformes). *Bulletin of Nansei National Fisheries Research Institute*, **27**:1-112.
- Isidro, E.J. 1984.** Age and growth of the bluemouth, *Helicolenus dactylopterus dactylopterus* (De la Roche, 1809), off the Azores. ICES Doc C.M., 1987/G:63, 6 pp.
- Isidro, E.J. 1987.** Contribuição para o estudo da biologia e pesca de boca negra, *Helicolenus dactylopterus* (De la Roche, 1809) dos açores. In: Relatório da 7ª Semana das Pascuas dos Açores (Anonymous, eds.). pp. 183-189. Horta: Secretaria Regional da Agricultura e Pescas, Direcção Regional das Pescas.
- Jacobs, G. 1977.** Gesamt-und organisch gebundener quecksilbergehalt in fischen aus deutschen fanggründen. *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und –Forschung*, **164**:71-76.
- Jamieson, B.G.M., 1987.** A biological classification of sperm types, with special reference to annelids molluscs, and an example of spermiocladistics. In *New Horizons in Sperm Cell Research* (Mohri, H., ed), pp. 331-332. New York: Gordon and Breach Science Publishers.
- Jamieson, B.G.M. 1991.** Fish evolution and sytematics: evidence from spermatozoa. Cambridge, UK: Cambridge University Press.
- Jamieson, B.G.M. 2009.** *Reproductive Biology and Phylogeny of Fishes* (Agnathans and Bony Fishes). Vol 8A. University of Queensland, Australia. Science Publishers.
- Jamieson, B.G.M., Leung, L.K.P. 1991.** Introduction to fish spermatozoa and the micropyle. In Jamieson B.G.M., editor. Fish evolution and systematics:

evidence from spermatozoa. Cambridge: Cambridge University Press. pp 56-72.

Johansen, T., Nerdreaas, K., Naevdal, G. 1993. Electrophoretic discrimination of bluemouth, *Helicolenus dactylopterus* (De La Roche, 1809), from *Sebastes* spp. In the northeast Atlantic. *Sarsia*, **78**:25-29.

Jones, R.E., Petrell, R.J., Pauly, D. 1999. Using modified length-weight relationships to assess the condition of fish. *Aquaculture Engineering*, **20**:(4)261–76.

Justine, J.L. 1995. Spermatozoal ultrastructure and phylogeny in the parasitic Platyhelminthes. *Memoirs du Museum d'Histoire Naturelle*, **166**:55–86.

Kai, Y., Nakayama, K., Nakabo, T. 2003. Molecular phylogenetic prespective on speciation in the genus *Sebastes* (Scorpaenidae) from the northwest Pacific and the position of *Sebastes* within the subfamily Sebastidae. *Ichthyological Research*, **50**:239-244.

Kelly, C.J., Connolly, P.L., Bracken, J.J. 1999. Age estimation, growth, maturity, and distribution of the bluemouth rockfish *Helicolenus dactylopterus* (Delaroche, 1809) from the Rockall Trough. *ICES Journal of Marine Science*, **56**(1):61-74.

Kessel, R.G. 1983. The structure and function of annulate lamellae, porous cytoplasmic and intracellular membrane. *International Review of Cytology*, **82**:181-303.

Kessel, R.G. 1992. Annulate lamellae, a last frontier in cellular organelles. *International Review of Cytology*, **133**:43-100.

Kimmer, W., Avent, S.R., Bollens, S.M., Feyrer Grimaldo, L.F., Moyle, P.B., Nobriga, M., Visintainer, T. 2005. Variability in length-weight relationships used to estimate biomass of estuarine fish from survey data. *Transactions of the American Fisheries Society*, **134**:481–95.

Kimura, S., Tsukamoto, Y., Mori, K. 1989. Early development stages of the scorpaenid fish, *Scorpaena miostoma*, reared in the laboratory. *Japanese Journal of Ichthyology*, **35**:434-439.

Koslow, J.A. Boehlert, G.W., Gordon, J.D., Haedrich, R.L., Lorange, P., Parin, N. 2000. Continental slope and deep-sea fisheries: implications for a fragile ecosystem. *ICES Journal of Marine Science*, **57**:548-557.

Koya Y., Matsubara, T. 1995. Ultrastructural observations on the inner ovarian epithelia of kichiji rockfish *Sebastolobus macrochir* with special reference to the production of gelatinous material surrounding the eggs. *Bulletin of the Hokkaido National Fisheries Research Institute*, **59**:1-17.

Koya, Y., Muñoz, M. 2007. Comparative study on ovarian structures in scorpaenids: possible evolutionary process of reproductive mode. *Ichthyological Research*, **54**:221-230.

Koya, Y., Munehara H., Takano K., Takahashi H. 1993a. Effects of extracellular environments on the motility of spermatozoa in several marine sculpins with internal gametic association. *Comparative Biochemistry and Physiology*, **106A**:25-29.

Koya, Y., Takano K., Takahashi. 1993b. Ultrastructural observations on sperm penetration in the egg of elkhorn sculpin *Alcichthys alcicornis*, showing internal gametic association. *Zoological Science*, **10**:93-101.

Koya, Y., Munehara H., Takano K. 1993d. Secretion habilities of epithelia of ovarian wall and ovigerous lamella lining the ovarian cavity of masked greenling, *Hexagrammos octogrammus*. *Japanese Journal of Ichthyology*, **40** (2):199-208. (in Japanese with English abstract).

Koya, Y., Munehara, H., Takano, K. 1994. Reproductive cycle and spawning ecology in elkhorn sculpin, *Alcichthys alcicornis*. *Japanese Journal of Ichthyology*, **41**(1):39.

Koya, Y., Takano K., Takahashi. 1995. Annual changes in fine structure of inner epithelial lining of the ovary of a marine sculpin, *Alcichthys alcicornis* (Teleostei: Scorpaeniformes), with internal gametic association. *Journal of Morphology*, **223**:85-97.

Koya, Y., Munehara H., Takano K. 1997. Sperm storage and degradation in the ovary of a marine copulating sculpin, *Alcichthys alcicornis* (Teleostei:Scorpaeniformes): role of intercellular junctions between inner ovarian epithelial cells. *Journal of Morphology*, **233**:153-163.

Koya, Y., Munehara, H., Takano, K. 2002. Sperm storage and motility in the ovary of the marine sculpin *Alcichthys alcicornis* (Teleostei:Scorpaeniformes), with internal gametic association. *Journal of Experimental Zoology*, **292**:145-155.

- Krefft, G. 1961.** A contribution to the reproductive biology of *Helicolenus dactylopterus* (De la Roche, 1809) with remarks on the evolution of the Sebastinae. *Rapports et Procès-verbaux des Réunions Conseil International pour l'Exploration de la Mer*, **150**:243-244.
- Krüger, von K.E., Nieper, L., Auslitz, H.-J. 1975.** Bestimmung des quecksilber-gehalts der seefische auf den fangplätzen der deutschen hochsee- und küstenfischerei. *Archiv für Lebensmittel-Hygiene*, **26**:201-207.
- Kusakari, M. 1995.** Studies on the reproductive biology and artificial juvenile production of kurosoi *Sebastes schlegeli* (Hilgendorf). *Scientific Reports of Hokkaido Fisheries Experimental Station*, 47:41-124. (in Japanese with English abstract).
- Kusakari, M., Mori, Y., Kudo, K. 1977.** Studies on the breeding habit of a rockfish, *Sebastes schlegeli* (Hilgendorf). 2. On the breeding behavior of pregnant fish and the just spawned larvae. *J. Hokkaido Fish. Exp. Sm.*, Vol. **34**, pp. 1-11.
- Lahnsteiner, F., Patzner, R.A. 1998.** Sperm motility of the marine teleosts *Boops boops*, *Diplodus sargus*, *Mullus barbatus* and *Trachurus mediterraneus*. *Journal of Fish Biology*, **52**:726-742.
- Lahnsteiner, F., Patzner, P.A., Weismann, T. 1993a.** The efferent duct system of the male gonads of the European pike (*Esox lucius*): testicular efferent ducts, testicular main ducts, and spermatic ducts. A morphological, fine structural and histochemical study. *Journal of Submicroscopic Cytology and Pathology*, **25**:468-498.
- Lahnsteiner, F., Patzner, P.A., Weismann, T. 1993b.** The spermatic ducts of salmonid fishes (Salmonidae, Teleostei). Morphology, histochemistry, and composition of the secretion. *Journal of Fish Biology*, **42**:79-93.
- Lahnsteiner, F., Patzner, P.A., Weismann, T. 1994.** Testicular main ducts and spermatic ducts in some cyprinid fishes I. Morphology, fine structure and histochemistry. *Journal of Fish Biology*, **44**:937-951.
- Lahnsteiner, F., Weismann, T., Patzner, R.A., 1997.** 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.

- Lambert, T.C., Ware, D.M. 1984.** Reproductive strategies of demersal and pelagic spawning fish. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, **41**:1565-1569.
- Lambert, Y., Dutil, J.D. 2000.** Energetic consequences of reproduction in Atlantic cod (*Gadus morhua*) in relation to spawning level of somatic energy reserves. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, **57**:815-825.
- Lanier, D.L., Estep, D.G., Dewsbury, D.A. 1979.** Role of prolonged copulatory behaviour in facilitating reproductive success in a competitive mating situation in laboratory rats. *Journal of Comparative Biochemistry and Physiology*, **93**:781-792.
- Le Cren, E.D. 1951.** The length–weight relationship and seasonal cycle in gonad weight and condition on the perch (*Perca Fluviatilis*). *Journal of Animal Ecology*, **20**:(2)201–19.
- Lee, J.S., Oh, Y.K., Huh, S-H. 1997.** Fine structural observations on spermatogenesis of the goldeye rockfish, *Sebastes thompsoni* (Teleostei: Scorpaenidae). *Journal of the Korean Fisheries Society*, **30** (6):1005-1012.
- Lewis, S.M., Austad, S.N. 1990.** Sources of intraspecific variation in sperm precedence in red flour beetles. *American Naturalist*, **135**:351-359.
- Lisovenko, L.A. 1979.** Reproduction of rockfishes (Family Scorpaenidae) off the Pacific coast of South America. *Journal of Ichthyology*, **18**:262-268.
- Liu, X-H, Zhang, T.T, Rawson, D.M. 1997.** A preliminary study on vitrification of intact zebrafish (*Brachydanio rerio*) embryos using methanol. *Cryobiology*, **35**(4):372.
- Lodge, J,R, Fechheimer, N.S., Jaap, R.G. 1971.** The relationship of in-vivo sperm storage interval to fertility and embryonic survival in the chicken. *Biology of Reproduction*, **5**:252-257.
- Loman, J., Madsen, T., Hakansson, T. 1988.** Increased fitness from multiple matings and genetic heterogeneity: a model of a possible mechanism. *Oikos*, **52**:69-72.
- Lombardi, J., Wourms, J.P. 1985.** The trophotaenial placenta of a viviparous goodeid fish. 111: Protein uptake by trophotaeniae, the embryonic component. *Journal of Experimental Zoology*, **236**:165-179.

- Lou, Y.H., i Takahashi, H. 1989.** The blood-testis barrier and its breakdown following immunization to testis material in the Nile tilapia, *Oerochromis niloticus*. *Cell Tissue Research*, **258**:491-498.
- Love, R.M. 1980.** *The Chemical Biology of Fishes*. Vol.2, 943 pp. Academic Press, London.
- Luquet, P., Watanabe, T. 1986.** Interaction “nutrition-reproduction” in fish. *Fish Physiology and Biochemistry*, **2**:121-129.
- Lloris, D. 1986.** Ictiofauna demersal y aspectos biogeográficos de la costa sudoccidental de Àfrica (SWA/Namíbia). Bas, C., Macpherson, E., Rucabado, J.A. eds. pp. 306-307. Monografías de zoología marina, 1.
- Lloris, D., Messeguer, S. 2000.** Recursos marins del Mediterrani. Fauna i flora del Mar Català. Departament d'agricultura, ramaderia i pesca, Barcelona. p 129.
- MacGregor, J.H. 1970.** Fecundity, multiple spawning, and description of the gonads in *Sebastes*. *U.S. Fish and Wildlife Service; Special Scientific Report Fisheries*, 596, 12 p.
- MacPherson, E. 1979.** Estudio sobre el regimen alimentario de algunos peces en el Mediterraneo occidental. *MISC.-ZOOLOG.* Vol.5:93-107.
- MacPherson, E., Duarte, C.M. 1991.** Bathymetric trends in demersal fish size: is there a general relationship? *Marine Ecology Progress Series*, vol. **71**:103-112.
- Madurell T., Cartes J.E. 2005.** Trophodynamics of a deep-sea demersal fish assemblage from the bathyal eastern Ionian Sea (Mediterranean Sea). *Deep-Sea Research I*, **52**:2049-2064.
- Mandrytsa, S.A. 2001.** Seismosensory system and classification of scorpionfishes (Scorpaeniformes: Scorpaenoidei). *Perm State University Press*, Perm.
- Marcaillou, C., Szöllösi, A. 1980.** The “blood-testis” barrier in a nematode and a fish: a generalizable concept. *Journal of Ultrastructural Research*, **70**:128-136.
- Marinaro, J.Y. 1968.** Contribution à l'étude des oeufs et larves pélagiques de poissons méditerranéens, IV. Les premiers stades de développement de *Helicolenus dactylopterus*. *Pelagos*, **10**:133-138.
- Massutí, E., Morales-Nin, B., Gil de Sola, L., Prats, L. 2000a.** Bathymetric distribution and biological parameters of the bluemouth, *Helicolenus*

dactylopterus (Pisces: Scorpaenidae) in the western Mediterranean. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, **81**:129-141.

Massutí, E., Morales-Nin, B., Moranta, J. 2000b. Age and growth of blue-mouth, *Helicolenus dactylopterus* (Osteichthyes: Scorpaenidae), in the western Mediterranean. *Fisheries Research*, **46**:165-176

Massutí, E., Moranta, J., Gil de Sola, L., Morales-Nin, B., Prats, L. 2001. Distribution and population structure of the bluemouth *Helicolenus dactylopterus* (Pises: Scorpaenidae) in the Western Mediterranean. *Journal of the Marine Biological Association UK*, **89**:129-141.

Matsubara, K. 1943. Ichthyological annotations from the depth of the Sea of Japan. VIII-IX. *Journal Sigenkagaku Kenkyusyo*, vol.1(nº 2):131-152.

Mattei, X. 1970. Spermiogenése comparée des poissons. In: Baccetti B, editor. Comparative spermatology. New York: Academic Press. pp. 57-70.

Mattei, X. 1988. The flagellar apparatus of spermatozoa in fish. Ultrastructure and evolution. *Biology of the Cell*, **63**:151-158.

Mattei, X. 1991. Spermatozoon ultrastructure and its systematic implications in fishes. *Canadian Journal of Zoology*, **69**:3038-3055.

Mattei, X, Siau, Y., Thiaw, O.T., Thiam, D. 1993. Peculiarities on the organization of testis of *Ophidion* sp. (Pisces, Teleostei). Evidence for two types of spermatogenesis in teleost fish. *Journal of Fish Biology*, **43**:931-937.

Mellinger, J. 2002. Sexualite et Reproduction des Poissons. CNRS Editions, Paris, FR.

Mendez, E., Jachmanian, I. i Grompone, M.A. 1993. Lipid distribution in blacbelly rosefish (*Helicolenus dactylopterus lahillei*) in relation to its possible functions as hydrostatic agent and energy reserve. *Comparative Biochemistry and Physiology*, **105B**:193-198.

Menezes, G.M., da Silva, H., Krug, H. et al. 1997. Design optimization and implementation of demersal cruise surveys in Macaronesian archipelagos - Final Report-Commision of the European Communities DG XIV/C/ study contract 94/034. Arquivos Do DOP *Série de Estudos*, 3(98):161.

Mianzan, H.W., Mari, N., Prenski, B., Sanchez, F. 1996. Fish predation on neritic ctenophores from the Argentine continental shelf: a neglected food source? *Fisheries Research*, **27**:69-79.

- Mito, S., Uchida, K. 1956.** On the egg development and hatched larvae of a scorpaenid fish, *Pterois lunulata* Temmick et Schlegel. *Science Bulletin of the Faculty of Agriculture of Kyushu University*, **16**:381-385.
- Miura, T. 1999.** Spermatogenetic cycle in fish. *Encyclopedia of Reproduction*, Vol.4. pp. 571-578.
- Miyachi, K., Fritzler, M.J., Tan, E.M. 1978.** Autoantibody to a nuclear antigen in proliferating cells. *Journal of Immunology*, **121**:2228-2234.
- Moller, A.P. 1997.** Developmental selection against developmentally unstable offspring and sexual selection. *Journal of Theoretical Biology*, **185**:415-422.
- Monteiro L.R., Isidro E.J., Lopes H.D. 1991.** Mercury content in relation to sex, size, age and growth in two scorpionfish (*Helicolenus dactylopterus* and *Pontinus kuhlii*) from Azorean waters. *Water, Air, and Soil Pollution*, **56**:359–367.
- Morales-Nin, B. 1989.** Edad, crecimiento y mortalidad de *Helicolenus dactylopterus* (Cuvier) en aguas de Namibia. *Collection of Scientific Papers of the International Commission for SE Atlantic Fisheries*. pp. 243-248.
- Mori, H., Nakagawa, M., Soyano, K., Koya, Y. 2003.** Annual reproductive cycle of black rockfish *Sebastes schlegeli* in captivity. *Fisheries Science*, **69**:910-923.
- Moser, H.G. 1967a.** Reproduction and development of *Sebastes paucispinis* and comparison with other rockfishes off southern California. *Copeia*, **1967**:773-797.
- Moser, H.G. 1967b.** Seasonal histological changes in the gonads of *Sebastes paucispinis* (Ayres), an ovoviviparous teleost (family Scorpaenidae). *Journal of Morphology*, **123**:329-351.
- Moser, H.G., Ahlstrom, E.H., Sandknop, E.M. 1977.** Guide to the identification of scorpionfish larvae (family Scorpaenidae) in the eastern Pacific with comparative notes on species of *Sebastes* and *Helicolenus* from other oceans. NOAA Technical Report NMFS, **402**, 71 p.
- Moyer, J.T., Zaiser, M.J. 1981.** Social organization and spawning behavior of the pteroine fish *Dendrochirus zebra* at Miyakejima, Japan. *Japanese Journal of Ichthyology*, **28**:52-69.
- Munehara, H. 1996.** Sperm transfer during copulation in the marine sculpin *Hemitripterus villosus* (Pisces: Scorpaeniformes) by means of a retractable genital duct and ovarian secretion in females. *Copeia* (1996), **2**:452-454.

- Munehara, H. 1997.** The reproductive biology and early life stages of *Podothecus sachi* (Pisces: Agonidae). *Fisheries Bulletin*, **95**:612-619.
- Munehara, H., Takano, K., Koya, Y. 1989.** Internal gametic association and external fertilization in the elkhorn sculpin, *Alcichthys alcicornis*. *Copeia*, **1989**:673-678.
- Munehara, H., Takano, K., Koya, Y. 1991.** The little dragon sculpin *Blepsias cirrhosus*, another case of internal gametic association and external fertilization. *Japanese Journal of Ichthyology*, **37**:391-394.
- Munehara, H., Koya, Y., Hayakawa, Y., Takano, K. 1997.** Extracellular environments for the initiation of external fertilization and micropylar plug formation in a cottid species, *Hemitripterus villosus* (Pallas) (Scorpaeniformes) with internal insemination. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, **211**:279-289.
- Muñoz, M. 2000.** Biología de la reproducció d'alguns escorpeniformes del Mediterrani occidental (Pisces, Teleostei). Tesi doctoral, Universitat de Girona. 313 pp.
- Muñoz, M., Casadevall, M. 2002.** Reproductive indices and fecundity of *Helicolenus dactylopterus dactylopterus* (Teleostei:Scorpaenidae) in the Catalan Sea (Western Mediterranean). *Journal of Marine Biology Association U.K.*, **82**:995-1000.
- Muñoz, M., Casadevall, M., Bonet, S. 1999.** Annual reproductive cycle of *Helicolenus dactylopterus dactylopterus* (Teleostei: Scorpaeniformes) with special reference to the ovaries sperm storage. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, **79**(3):521-529.
- Muñoz, M., Casadevall, M., Bonet, S., Quagio-Grassiotto, I. 2000.** Sperm storage structures of *Helicolenus dactylopterus dactylopterus* (Teleostei: Scorpaenidae): an ultrastructural study. *Environmental Biology of Fishes*, **58**:53-59.
- Muñoz, M.; Casadevall, M.; Bonet, S. 2001.** Gonadal structure and gametogenesis of *Aspitrigla obscura* (Pisces, Triglidae), *Italian Journal of Zoology*, **68**:39-46.
- Muñoz, M., Koya, Y., Casadevall, M. 2002a.** Histochemical analysis of sperm storage in *Helicolenus dactylopterus dactylopterus* (Teleostei: Scorpaenidae). *Journal of Experimental Zoology*, **292**:156-164.

- Muñoz, M., Casadevall, M., Bonet, S., 2002b.** Gametogenesis of *Helicolenus dactylopterus dactylopterus* (Teleostei: Scorpaenidae). *Sarsia*, **87**(2):119-127.
- Muñoz, M., Casadevall, M., Bonet, S. 2002c.** Testicular structure and semicystic spermiogenesis in a specialized ovuliparous species: *Scorpaena notata* (Pisces, Scorpaenidae). *Acta Zoologica* (Stockholm), **83**:213-219.
- Muñoz, M.; Casadevall, M.; Bonet, S. 2002d.** The ovarian morphology of *Scorpaena notata* (Teleostei: Scorpaenidae) shows a specialized mode of oviparity. *Journal of Fish Biology*, **61**:877-887.
- Muñoz, M.; Sàbat, M.; Mallol, S.; Casadevall, M. 2002e.** Gonadal structure and gametogenesis of *Trigla lyra* (Pisces, Triglidae). *Zoological Studies*, **41**:412-420.
- Muñoz, M., Hernández, M.R., Sàbat, M., Casadevall, M. 2003.** Annual reproductive indices and fecundity of *Aspitrigla obscura* (Teleostei, Triglidae). *Vie et Milieu*, **53** (2-3):123-129.
- Muñoz, M., Sàbat, M., Vila, S., Casadevall, M. 2005.** Annual reproductive cycle and fecundity of *Scorpaena notata* (Teleostei:Scorpaenidae). *Scientia Marina*, **69**(4):555-562.
- Muñoz, M., Dimitriadis, C., Casadevall, M., Vila, S., Delgado, E., Lloret, J., Saborido-Rey, F. (en revisió).** Spawning characteristics of *Helicolenus dactylopterus dactylopterus* in North-Western Mediterranean. *ICES Journal of Marine Science*.
- Nagahama, Y. 1983.** The functional morphology of teleost gonads. In: Hoar, M.A., Randall, D.J., Donaldson, E.M., editors. *Fish physiology*, vol. IX. Reproduction. Part A, endocrine tissues and hormones. New York: Academic Press. pp. 223-275.
- Needham, J. 1942.** *Biochemistry and morphogenesis*. Cambridge University Press, London and New York.
- Nelson, J.S. 1994.** *Fishes of the World. Third edition*. John Wiley & Sons, Inc., New York. 600 pp.
- Nelson, J.S. 2006.** *Fishes of the World*. Wiley, New York.
- Nichol, D.G., Pikitch, E.K. 1994.** Reproduction of darkblotched rockfish off the Oregon coast. *Transactions of American Fisheries Society*, **123**:469-481.
- Nouar, A. 2003.** Écologie, biologie et exploitation d'une espèce de la famille des Scorpaenidae, *Helicolenus dactylopterus dactylopterus* (Delaroche, 1809)

des côtes algériennes. Thèse de Doctorat d'État. Université des Sciences et de la Technologie Houari Boumediene, Alger, 154 pp.

Nouar, A., Maurin, C. 2000. Feeding habits of *Helicolenus dactylopterus dactylopterus* (Pisces: Scorpaenidae) of the algerian coast. *Cahiers de biologie marine*, **41**:313-320.

Oppenheimer, J.M. 1937. The normal stages of *Fundulus heteroclitus*. *The Anatomical Record*, **68**(1):1-15.

Ortego, L.S., Hawkins, W.E., Walter, W.W., Krol, R.M., Benson, W.H. 1995. Immunohistochemical detection of Proliferating Cell Nuclear Antigen (PCNA) in tissues of Aquatic Animals utilized in toxicity bioassays. *Marine Environmental Research*, **39**:271-273.

Orton, G.L. 1955. Early developmental stages of the California scorpionfish, *Scorpaena guttata*. *Copeia*, **1955**:210-214.

Paffenhofer, G.A., Rosenthal, H. 1968. Trockengewicht und kalorien-gehalt sich entwickelnder heringseier. *Helgolinder wiss. Meeresunters*, **18**:45-52.

Parenti, L.R., Grier, H.J. 2004. Evolution and phylogeny of gonad morphology in bony fishes. *Integrative and Comparative Biology*, **44**:333-348.

Pearcy, W.G. 1962. Egg masses and early developmental stages of the scorpaenid fish, *Sebastes*. *Journal of the Fisheries Research Board of Canada*, **19**:1169-1173.

Pearson, D. E., Hightower, J. E., Chan, J. T. H. 1991. Age, growth, and potential yield for shortbelly rockfish *Sebastes jordani*. *Fishery Bulletin*, **89**:403–409.

Pecio, A., Rafinski, J. 1994. Structure of the testes, spermatozoa and spermatozeugmata of *Mimagoniates barberi* Regan 1907 (Teleostei:Characidae), an internally fertilizing, oviparous fish. *Acta Zoologica*, **75**:179-185.

Pecio, A., Burns, J.R., Weitzman, S.H. 2005. Sperm and spermatozeugma ultrastructure in the inseminating species *Tytocharax cochui*, *T.tambopatensis*, and *Scopaeocharax rhinodus* (Pisces:Teleostei:Characidae:Glandulocaudinae: Xenurobryconini). *Journal of Morphology*, **263**:216-226.

Peirano, A., Tunesi, L., 1986. Preliminary notes on the biology of *Helicolenus dactylopterus* (Delaroche) in the Ligurian Sea. *Rapports de Committee Internationale de Mer Mediterranee*, **30**:233.

- Philippi, E. 1908.** Fortpflanzungsgeschichte der viviparen teleosteer *Glaridichthys januarius* und *G. decemmaculatus* in ihrem einfluss auf lebensweise, makroskopische und mikroskopische anatomie. *Zool Jahrb Abt F Anat*, **27**:1-94.
- Pinart, E., Bonet, S., Briz, M., Pastor, L.M., Sancho, S., Garcia, N., Badia, E., Bassols, J. 2001.** Related Lectin affinity of the seminiferous epithelium in healthy and cryptorchid post-pubertal boars. *International Journal of Andrology*, **24**(3):153-64.
- Potter, H., Kramer, C.R., 2000.** Ultrastructural observations on sperm storage of the platyfish, *Xiphophorus maculatus* (Teleostei: Poeciliidae): the role of the duct epithelium. *Journal of Morphology*, **245**:110-129.
- Prelich, G., Tan, C-K., Kostura, M., Mathews, M.B., So, A.G., Downey, K.M., Stillman, B. 1987.** Functional identity of proliferating cell nuclear antigen and a DNA polimerase- δ auxiliary protein. *Nature*, **326**:517-520.
- Pudney, J. 1993.** Comparative cytology of the non-mammalian Sertoli cell. In "The Sertoli Cell" (L.D.Russell, and M.D. Griswold, eds.), pp. 611-657. Cache River Press, Clearwater, F.L.
- Quagio-Grassiotto, I., Carvalho, E.D. 1999.** The ultrastructure of *Sorubium lima* (Teleostei, Siluriformes, Pimelodidae) spermatogenesis: premeiotic and meiotic periods. *Tissue & Cell*, **31**(6):561-567.
- Quaggio-Grassiotto, I., Oliveira C. 2007.** Sperm ultrastructure and a new type of spermiogenesis in two species of Pimelodidae, with a comparative review of sperm ultrastructure in Siluriformes (Teleostei: Ostariophysi). *Journal of Comparative Zoology*, **247**(1):55-66.
- Quagio-Grassiotto, I., Spadella, M.A., Carvalho, M., Oliveira C. 2005.** Comparative description and discussion of spermiogenesis and spermatozoal ultrastructure in some species of Heptapteridae and Pseudopimelodidae (Teleostei:Siluriformes). *Neotropical Ichthyology*, **3**(3):401-410.
- Ragonese, S. 1989.** L'Applicazione dell'equazione di von Bertalanffy generale: il caso di *Helicolenus dactylopterus* (Delar.) (Pises: Scorpaenidae) del Tirreno Settentrionale. *Oebalia*, **15**:753-762.
- Ragonese, S., Reale, B. 1992.** Estimation of mortality rates and crytical age of *Helicolenus dactylopterus dactylopterus* (Pises: Scorpaeniformes) in the Sicilian

Channel (Central Mediterranean). *Rapports de Committee Internationale de Mer Mediterranee*, **33**:307.

Ragonese, S., Reale, B. 1995. Distribuzione e crescita dello scorfano di fondale, *Helicolenus dactylopterus dactylopterus* (Delaroche, 1809), nello stretto di Sicilia (Mar Mediterraneo). *Biologia Marina Mediterranea*, **2**:269–273.

Ranzi, S. 1932. Le basi fisio-morphologistiche dello sviluppo embrionale dei Selaci. Parte I. *Pubblicazioni della Stazione Zoologica di Napoli*, **13**:209-290.

Ranzi, S. 1934. Le basi fisio-morphologistiche dello sviluppo embrionale dei Selaci. Parte II e III. *Pubblicazioni della Stazione Zoologica di Napoli*, **13**:331-437.

Rasotto, M.B., Cardellini, P., Marconato, E. 1987. The problem of sexual inversion in the minnow, *Phoxinus phoxinus* (L.). *Journal of Fish Biology*, **30**:51-57.

Renzoni, A. Baldi, F. 1975. Osservazioni sulla distribución di mercurio nella fauna del Mar Tirreno. *Acqua+Aria*, **8**:597-602.

Reynolds, E.S. 1963. Use of lead citrate at high pH as an electronopaque stain in electron microscopy. *Journal of Cell Biology*, **17**:208-13.

Ribas, D., Muñoz, M., Casadevall, M. Gil de Sola, L. 2006. How does the northern Mediterranean population of *Helicolenus dactylopterus dactylopterus* resist fishing pressure? *Fisheries Research*, **79**:285-293.

Ridley, M. 1993. *Evolution*. Blackwell, Oxford.

Robards, A.W., Wilson, A.J. 1993. *Procedures in Electron Microscopy*. Sussex, Wiley.

Robertson, D.A. 1974. Developmental energetics of southern pigfish (Teleostei: Congriopodidae). *New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research*, **8**:611-620.

Rogers, A.D. 1994. The biology of seamounts. *Advances in Marine Biology*, **30**:305-350.

Romanelli, M., Palladino, S., Tarulli, E., Ferretti, M. 1997. Stima dell'acrescimento di *Helicolenus d. dactylopterus* (Delaroche) in Adriatico Meridionale tramite esame dell *sagittae* di esemplari prelevati con reti a strascico e palangri di fondo. *Biologia Marina Mediterranea*, **4**:554-556.

Sàbat, M. 2002. La reproducció de l'escòrpora fosca *Scorpaena porcus* (Linné, 1758). DEA, Universitat de Girona (in Catalan).

- Sàbat, M. 2005.** L'oviparisme en la familia Scorpaenidae (Pisces: Scorpaeniformes). Tesi doctoral, Universitat de Girona. 216 pp.
- Saborido-Rey, J.F. 1994.** El género *Sebastes* Cuvier, 1829 (Pisces, Scorpaenidae) en el Atlántico Norte: identificación de especies y poblaciones mediante métodos morfométricos; crecimiento y reproducción de las poblaciones en Flemish Cap. Tesis doctoral, Universidad Autónoma de Madrid. 271 pp.
- Samat, A., Shukor, M. N., Mazlan, A.G., Arshad, A., Fatimah, M.Y. 2008.** Length-weight Relationship and Condition Factor of *Pterygoplichthys pardalis* (Pisces: Loricariidae) in Malaysia Peninsula. *Research Journal of Fisheries and Hydrobiology*, **3**(2):48-53.
- Sánchez, R.P., Acha, E.M. 1988.** Development and occurrence of embryos, larvae and juveniles of *Sebastes oculatus* with reference to two southwest Atlantic scorpaenids: *Helicolenus dactylopterus lahillei* and *Pontinus rathbuni*. *Meeresforschung*, **32**:107-133.
- Santos, M.N., Gaspar, M.B. Monteiro, C.C., Vasconcelos, P. 2002.** Gill net and long-line catch comparisons in a hake fishery: the case of southern Portugal. *Scientia Marina*, **66**:433-441.
- Sargent, J.R., Henderson, R.J., Tocher, D.R. 1989.** The lipids in Fish Nutrition, J.Halver (ed), 2nd edn. pp.153-217. Academic Press.
- Schwed, A. 1983.** Algunos aspectos de la biología del rouget, *Helicolenus dactylopterus lahillei*, Norman, 1937, en la Zona Comun de Pesca Argentino-Uruguaya. M.Sc. Thesis, Universidad de la Republica, Montevideo, 108 pp
- Scott, A.P., Baynes, S.M. 1980.** A review of the biology, handling and storage of salmonid spermatozoa. *Journal of Fish Biology*, **17**:707-739.
- Scrimshaw, N.S. 1945.** Embryonic development in poeciliid fishes. *Biology Bulletin* (Woods Hole, Mass.), **88**:233-246.
- Selman, K., Wallace, R.A. 1986.** Gametogenesis in *Fundulus heteroclitus*. *American Zoologist*, **26**:173-192.
- Selman, K., Wallace, R.A. 1989.** Cellular aspects of oocyte growth in teleosts. *Zoological Science*, **6**:211-231.
- Sequeira, V., Figueredo, I., Muñoz, M., Gordo, L.S. 2003.** New approach to the reproductive biology of *Helicolenus dactylopterus*. *Journal of Fish Biology*, **62**: 1206-1210.

- Sequeira, V., Vila, S., Neves, A., Nunes, M.L., Vieira, A.R., Muñoz, M., Gordo, L.S. (en revisió).** *Helicolenus dactylopterus dactylopterus* (Delaroche, 1809) gelatinous matrix in the context of its reproductive strategy.
- Setchell, B.P., Waites, G.M.H. 1975.** The blood-testis barrier. In: Hamilton, D.W., Greep, R.O. (eds). *Handbook of physiology, Section 7: Endocrinology vol. V. Male reproductive system.* American Physiology Society Washington. pp. 143-172.
- Sever, D.M. 2002.** Female sperm storage in Amphibians. *Journal of Experimental Zoology*, **292**:165-179.
- Shibata, N., Hamaguchi, S. 1986.** Electron microscopic study of the blood-testis barrier in the teleost, *Oryzias latipes*. *Zoological Science*, **3**:331-338.
- Shinomiya, A. 1985.** Studies on the reproductive physiology and ecology in three marine cottid fish. Ph D Thesis. Hokkaido University.
- Sivinski, J. 1984.** Sperm in competition. In Sperm competition and the evolution of *Oligocottus maculosus*. *Journal of Ultrastructural Research*, **27**:230-243.
- Skinner, M.K. 2005.** Sertoli cell secreted regulatory factors. *Sertoli Cell Biology*. Chapter 8. Skinner, M.K., Griswold, M.D. editors. Elsevier Science (USA).
- Smith, S. 1957.** Early development and hatching. *The Physiology of Fishes*, **1**:323-359.
- Smith, M.M., Heemstra, P.C. 1986.** Smith' sea fishes. pp 1047. South Africa: Spring-Verlag.
- Soley, J.T., Van Vuren, J.H.J. 1984.** Phagocytic properties of Sertoli cells in the testis of the teleost *Tilapia rendalli* (Cichlidae). *Proceedings of Electronmicroscopic Society of South Africa*, **14**:123-124.
- Sorokin, V.P. 1961.** The redfish: gametogenesis and migrations of the *Sebastes marinus* (L.) & *Sebastes mentella* Travin. *Rapports et Procès-verbaux des Réunions Conseil International pour l'Exploration de la Mer*, **150**:245-250.
- Sparta, A. 1928.** Nastro galleggiante di uova di Teleostei. *R. Comitato Talassografico Italiano Memoria*, **145**:1-13.
- Sparta, A. 1941a.** Contributo alla conoscenza dello sviluppo embrionale e post-embrionale nelgi Scorpaenidi I.-*Scorpaena porcus* L. *Archivio di Oceanografia e Limnologia Roma*, **1**:109-115.

- Sparta, A. 1941b.** Contributo alla conoscenza di uova, staid embrionali e post-embrionali negli Scorpaenidi II.- *Scorpaena scrofa* L., III.- *Scorpaena ustulata* Lowe., IV.- *Scorpaena dactiloptela* Delaroche. *Archivio di Oceanografia e Limnologia Roma*, **1**:203-210.
- Stockley, P., Gage, M.J.G., Parker, G.A., Moller, A.P. 1997.** Sperm competition in fish: the evolution of testis size and ejaculate characteristics. *American Naturalist*, **149**:933-954.
- Stoumboudi, M., Th., Villwock, W., Sela, J., Abraham, M. 1993.** Gonadosomatic index in *Barbus longiceps*, *Capoeta damascina* and their natural hybrid (Pisces, Cyprinidae), versus spermatozoan index in the parental males. *Journal of Fish Biology*, **43**:865-875.
- Strüssmann, C.A., Nakamura, M. 2002.** Morphology, endocrinology, and environmental modulation of gonadal sex differentiation in teleost fishes. *Fish Physiology and Biochemistry*, **26**:13-29.
- Szöllösi, A., Marcaillou, C. 1977.** Electronmicroscope study of the blood-testis barrier in an insect: *Locusta migratoria*. *Journal of Ultrastructural Research*, **59**:158-172.
- Takahashi, S. 1981.** Sexual maturity of the Isaza, *Chaenogobius isaza* II. Gross morphology and histology of the ovary. *Zoological Magazine*, **90**:54-61.
- Takahashi, H., Takano, K., Takemura, A. 1991.** Reproductive cycles of *Sebastes taczanowskii*, compared with those of other rockfishes of the genus *Sebastes*. *Environmental Biology of Fishes*, **30**:23-30.
- Takano, K. 1987.** XII. Gonad. In: Ochiai, A. (ed.), *Fish Anatomy*, Midori-Shobo, Tokyo. pp.195-219 (en japonais).
- Takano, K. 1989.** I-1. Ovarian structure and gametogenesis. In: Takashima, F. i Hanyu, I. (eds.), *Reproductive Biology of Fish and Shellfish*, Midori-Shobo, Tokyo. pp.3-34 (en japonais).
- Takano, K., Hiroi, O., Yasukawa, M., Suetake, T. 1973.** Studies on the retention of gametes of salmonid fishes. 1. On the fertility of chum salmon eggs after storage. *Scientific Reports of the Hokkaido Salmon Hatchery*, **27**:31-37.
- Takemura, A., Takano, K., Takahashi, H. 1987.** Reproductive cycle of a viviparous fish, white-edged rockfish, *Sebastes taczanowskii*. *Bulletin of the Faculty of Fisheries, Hokkaido University*, **38**:111-125.

- Tan, C., Castillo, C., So, A.G., Downey, K.M. 1986.** An auxiliary protein for DNA Polymerase- δ from fetal calf thymus. *The Journal of Biological Chemistry*, **261**(26):12310-12316.
- Tandler, B., Moriber, L.G. 1966.** Microtubular structures associated with the acrosome during spermiogenesis in the water-strider, *Gerris remingis* (Say). *Journal of Ultrastructural Research*, **14**:391-404.
- Tateishi, S., Mizue, K., Inao, T. 1958.** Histological study about the ovaries of several kinds of ovoviviparous teleost. *Bulletin of the Faculty of Fisheries, Nagasaki University*, **7**:47-50 (In Japanese with English abstract).
- Terner, C. 1979.** Metabolism and energy conversion during early development. In (W.S. Hoar and D.J. Randall and J.R. Brett, eds.) *Fish physiology*, Vol.8, pp.261-278. Academic Press, New York.
- Terrats, A., Petrakis, G. 2001.** Reproductive cycle and fecundity of blue-mouth (*Helicolenus dactylopterus*, Delaroche, 1809) in the eastern Mediterranean (Ionian Sea, Greece). *Rapports de la Commission Internationale de la Mer Méditerranée*, **36**:329.
- Thibault, R.E., Schultz, R.J. 1978.** Reproductive adaptations among viviparous fishes (Cyprinodontiformes:Poeciliidae). *Evolution*, **32**:320-333.
- Tokuyasu. K.T. 1974.** Dynamics of spermiogenesis in *Drosophila melanogaster*. IV. Nuclear transformation. *Journal of Ultrastructural Research*, **48**:284-303.
- Tokuyasu. K.T. 1975.** Dynamics of spermiogenesis in *Drosophila melanogaster*. V. Head-tail alignment. *Journal of Ultrastructural Research*, **50**:117-129.
- Uiblein, F., Lorance, P., Latrouite, D. 2003.** Behaviour and habitat utilization of seven demersal fish species on the Bay of Biscay continental slope, NE Atlantic. *Marine Ecology Progress Series*, **257**:223-232.
- Ungaro, N., Marano, G., 1995.** Analytical models for Mediterranean species: an application on the *Helicolenus dactylopterus* (Delaroche) resource in the Lower Adriatic. *Rapports de Committee Internationale de Mer Mediterranee*, **34**:260.
- Vila, S.; Muñoz, M.; Sàbat, M.; Casadevall, M. 2007a.** Annual cycle of stored spermatozoa within the ovaries of *Helicolenus dactylopterus dactylopterus* (Teleostei, Scorpaenidae). *Journal of Fish Biology*, **71**:596-609.

- Vila, S., Sàbat, M., Hernandez, M.R , Muñoz, M. 2007b.** Intraovarian sperm storage in *Helicolenus dactylopterus dactylopterus* : Fertilization, crypt formation and maintenance of stored sperm. *The Raffles Bulletin of Zoology* ,**14**:21-27.
- Vládiz, T., Afzelius, B.A. Bronnikov, G.E. 2002.** Sperm quality as reflected through morphology in salmon alternative life histories. *Biological Reproduction*, **66**:98-105.
- Waga, S., Stillman, B. 1994.** Anatomy of a DNA replication fork revealed by reconstitution of SV40 DNA replication *in vitro*. *Nature*, **369**:207-211.
- Wallace, R.A., Selman, K. 1981.** Cellular and dynamic aspects of oocyte growth in teleosts. *American Zoologist*, **21**:325-343.
- Walter, I., Tschulen, W., Schabuss, M., Miller, I., Grillitsch, B. 2005.** Structure of the seminal pathway in the European chub, *Leuciscus cephalus* (Cyprinidae); Teleostei. *Journal of Morphology*, **263**:375-391.
- Wambiji, N., Ohtomi, J., Fulanda, B., Kimani, E., Kulundu, N., Hossain, M.D.Y. 2008.** Morphometric Relationship and Condition Factor of *Siganus stellatus*, *S. canaliculatus* and *S. sutor* (Pisces: Siganidae) from the Western Indian Ocean Waters. *South Pacific Studies* Vol.**29**,nº1.
- Washington, B.B., Moser, H.G., Laroche, W.A., Richards, W.J. 1984.** Scorpaeniformes: developpement. In Moser, H.G., Richards, W.J., Cohen, D.M., Fahay, M.F., Kendall, A.W., Richardson, S.L. (Eds.) *Ontogeny and Systematics of Fishes*. Vol. I. American Society of Ichthyologists and Herpetologists, Special Publication. pp.405-428.
- Watanabe, T. 1985.** Importance of the study of broodstock nutrition for further development of aquaculture. pp.395-414. *In*: C.B. Cowey, A.M. Mackie, & J.G. Bell (ed.) *Nutrition and feeding in fish*. Academic Press, London.
- Wertz, M. 1977.** Osservazioni sull'alimentazione de *Helicolenus dactylopterus* (DelaRoche, 1809) (Osteichthyes, Scorpaenidae) dei fondi batiali stras cicabili del Mar Ligure. *9º Congr. Della Societa Italiana di Biologia Marina*. Lacco Ameno d'Ischia (Italy).
- West, L. 1990.** A review of existing and potential data systems for recreational fishing for tunas and billfishes- east coast of Australia. Internal report for the Department of Primary Industries and Energy and the East Coast Tuna Management Advisory Committee. *Kegawama Research*, Tewantin. 69 pp.

- White, D.B., Wyanski, D.M., Sedberry, G.R. 1998.** Age, growth and reproductive biology of the blackbelly rosefish from the Carolinas, U.S.A. *Journal of Fish Biology*, **53**:1274-1291.
- Whitehead, J.P.J., Bauchot, M.L., Hureau, J.C., Nielsen, J., Tortonese, E. (Edit.), 1986.** Fishes from the North-eastern Atlantic and the Mediterranean. Vol.2:511-1007 i vol.3:1008-1473. UNESCO.
- Williams, G.C. 1975.** *Sex and Evolution*. Princeton University Press, Princeton.
- Windom, H.L., Kendall, D.R. 1979. Accumulation and biotransformation of mercury in coastal and marine biota. In: *The Biogeochemistry of Mercury in the Environment*, J.O. Nriagu (Ed.), Elsevier/North-Holland, Amsterdam. pp.303-323.
- Withell, A.F., Wankowski, J.W. 1988.** The effects of different otolith aging techniques on estimates of growth and mortality for the splitnose rockfish, *Sebastes diplopro* and canary rockfish, *S. pinniger*. *California Fish and Game*, **76**:146-160.
- Wootton, R. J. 1979.** Energy costs of egg production and environmental determinants of fecundity in Teleost fishes. In *Fish Phenology: Anabolic Adaptiveness in Teleosts* (Miller, P. J., ed.). pp.133–159. London: Academic Press.
- Wootton, R.J. 1990.** Ecology of Teleost Fishes. London: Chapman & Hall.
- Wourms, J.P. 1981.** Viviparity: The maternal-fetal relationship in fishes. *American Zoologist*, **21**:473-515.
- Wourms, J.P. 1991.** Reproduction and development of *Sebastes* in the context of the evolution of piscine viviparity. *Environmental Biology of Fishes*, **30**:111-126.
- Wourms, J.P., Lombardi, J. 1992.** Reflections on the evolution of piscine viviparity. *American Zoologist*, **32**:276-293.
- Wourms, J.P., Grove, B.D., Lombardi, J. 1988.** The maternal-embryonic relationship in viviparous fishes. In: Hoar WS, Randall DJ, editors. *Fish Physiology*, vol **11B**:1-134. San Diego: Academic Press.
- Würtz, M. 1977.** Osservazioni sull'alimentazioni di *Helicolenus dactylopterus* (Delaroche, 1809) (Osteichthyes, Scorpaenidae) dei fondi batiali strascicabili del Mar Ligure. *Atti del IX Congresso della Società Italiana di Biologia Marina*, Lacco Ameno d'Ischia, 19-22 Maggio. pp.465-469.

- Yamada, J., i Kusakari, M. 1991.** Staging and the time course of embryonic development in kurosoi, *Sebastes schlegeli*. *Environmental Biology of Fishes*, **30**:103-110.
- Yamamoto, T.S. 1955.** Ovulation in the salmon, herring and lamprey. *Japanese Journal of Ichthyology*, **4**:182-192 (en japonès amb abstract anglès).
- Yamamoto, T.S. 1963.** Eggs and ovarios of the stickleback, *Pungitius tymensis*, with a note on the formation of a jelly-like substance surrounding the egg. *Journal of the Faculty of Science, Hokkaido University. Series VI, Zoology*, **15**:190-201.
- Yamamoto, K. 1963.** Cyclical changes in the wall of the ovarian lumen in the medaka, *Orzias latipes*. *Annotationes Zoologicae Japonenses*, **36**:479-186
- Yao, Z., Emerson, C.J., Crim, L.W. 1995.** Ultrastructure of the spermatozoa and eggs of the ocean pout (*Macrozoarces americanus* L.), an internally fertilizing marine fish. *Molecular Reproduction and Development*, **42**:58-64.
- Yoneda, M., Miura, H., Mitsuhashi, M., Matsuyama, M., Matsuura, S. 2000.** Sexual maturation, annual reproductive cycle, and spawning periodicity of the shore scorpionfish, *Scorpaenodes littoralis*. *Environmental Biology of Fishes*, **58**:307-319.
- Yoshizake, G., Takeuchi, Y., Kobayashi, T., Ihara, S., Takeuchi, T. 2002.** Primordial germ cells: the blueprint for a piscine life. *Fish Physiology and Biochemistry*, **26**:3-12.
- Young, D.R., Mearns, A.J., Jan, T.-K., Heesen, T.C., Moore, M.D., Eganhouse, R.P., Hershelman, G.P., Gossett, R.W. 1980.** Trophic structure and pollutant concentrations in marine ecosystems of southern California, CalCOFI Rep. XXI. pp.197-206.
- Zerouali-Khodja, F., Zemiti, L., Nouar, A. 2006.** Quelques aspects sur le mode de reproduction de la rascasse *Helicolenus dactylopterus dactylopterus* (Delaroche, 1809) des côtes algériennes. *Bulletin de la Société Zoologique de France*, **1311**(1):43-51.
- Zhang, T.T., Rawson, D.M. 1995.** Studies on chilling sensitivity of zebrafish (*Brachydanio rerio*) embryos. *Cryobiology*, **32**:239-246.

7. ANNEX:

En les següents pàgines es presenten les dades morfomètriques i gravimètriques dels exemplars d'*Helicolenus dactylopterus dactylopterus* que es van recol·lectar per a l'elaboració d'aquest treball:

Les dades que s'hi mostren són les següents:

- Per les mostres recollides a varis ports de la Costa Brava els anys 2007-2008:
 - Individu: HDGL001001 El codi HD indica l'espècie: *Helicolenus dactylopterus dactylopterus*; GL: àrea de pesca, Golf de Lleó; 001: nº de vol; 001: nº d'exemplar de cada vol.
 - LT: Longitud total en mil·límetres
 - PT: Pes total en grams
 - PEgr: Pes eviscerat en grams
 - Sexe: M: Mascle
F: Femella
I: Indiferenciat
 - Posició: Zona de captura
 - Profunditat: Profunditat a la que s'havia obtingut l'exemplar
 - Data: Data de la captura
 - Gen: Anàlisi genètic (si/no)
 - Morfo: Anàlisi morfomètric (si/no)
 - Repro: Anàlisi de la reproducció (si/no)
- Per les mostres obtingudes a la llotja durant els anys 2003, 2004, 2005 i 2006:
 - Individu: El codi HD indica l'espècie: *Helicolenus dactylopterus dactylopterus*; l'any i el mes de captura i finalment la numeració de l'individu.
 - LT: Longitud total en mil·límetres
 - PT: Pes total en grams
 - PEgr: Pes eviscerat en grams

-Sexe: M: Mascle

F: Femella

I: Indiferenciat

-Pes gònada (gr): Pes de la gònada en grams

-Pfetge (gr): Pes del fetge en grams

-LS: Longitud estàndard en mil·límetres

-LpA: Longitud pre-anal en mil·límetres

-Greix: Quantitat de greix visceral en grams.

Pel que fa a la seva procedència: Les mostres obtingudes els anys 2003 i 2004 procedeixen del port de Palamós, de l'embarcació "Som i Serem". Els exemplars corresponents als anys 2005 i 2006 provenien del port de Llançà, concretament de l'embarcació "Palandriu".

FEMELLES										
Exemplar	LTmm	PTgr	PEgr	sexe	posició	profunditat	data	Gen	Morfo	Repro
HDGL022012	28	348,0	331,7	?			2008.02.08	no	no	si
HDGL001001	283	478,1	410,6	F	Seta (42º 43.85/ 3º 39.63)	160-180	2007.01.22	no	no	si
HDGL001002	275	426,6	359,2	F	Seta (42º 43.85/ 3º 39.63)	160-180	2007.01.22	no	no	si
HDGL001004	310	560,2	497,1	F	Seta (42º 43.85/ 3º 39.63)	160-180	2007.01.22	no	no	si
HDGL001006	269	401,1	352,5	F	Seta (42º 43.85/ 3º 39.63)	160-180	2007.01.22	no	no	si
HDGL001009	268	359,2	314,2	F	Seta (42º 43.85/ 3º 39.63)	160-180	2007.01.22	no	no	si
HDGL001010	285	452,7	397,8	F	Seta (42º 43.85/ 3º 39.63)	160-180	2007.01.22	no	no	si
HDGL001013	278	401,6	342,9	F	Seta (42º 43.85/ 3º 39.63)	160-180	2007.01.22	no	no	si
HDGL001014	225	235,2	210,5	F	Seta (42º 43.85/ 3º 39.63)	160-180	2007.01.22	no	no	si
HDGL001015	277	361,0	330,0	F	Seta (42º 43.85/ 3º 39.63)	160-180	2007.01.22	no	no	si
HDGL001016	274	403,6	365,2	F	Seta (42º 43.85/ 3º 39.63)	160-180	2007.01.22	no	no	si
HDGL001018	240	260,0	328,9	F	Seta (42º 43.85/ 3º 39.63)	160-180	2007.01.22	no	no	si
HDGL003001	239	300,0	248,8	F	fluviana, fons rocós	180	2007.02.05	no	no	si
HDGL003002	232	253,1	226,9	F	fluviana, fons rocós	180	2007.02.05	no	no	si
HDGL003003	250	351,4	321,2	F	fluviana, fons rocós	180	2007.02.05	no	no	si
HDGL003005	297	493,0	432,1	F	fluviana, fons rocós	180	2007.02.05	no	no	si
HDGL003008	187	104,5	97,1	F	fluviana, fons rocós	180	2007.02.05	no	no	si
HDGL003009	215	185,9	166,3	F	fluviana, fons rocós	180	2007.02.05	no	no	si
HDGL003011	269	374,1	318,6	F	fluviana, fons rocós	180	2007.02.05	no	no	si
HDGL003012	204	161,2	142,1	F	fluviana, fons rocós	180	2007.02.05	no	no	si
HDGL004001	338	788,6	692,3	F	fluviana, fons rocós	160	2007.02.05	no	no	si
HDGL002001	380	1100,4	924,1	F	unes 17 milles de Blanes	160	2007.02.22	no	no	si
HDGL004003	334	698,3	633,2	F	unes 17 milles de Blanes	140	2007.02.22	no	no	si
HDGL004004	369	975,9	8702,8	F	unes 17 milles de Blanes	140	2007.02.22	no	no	si
HDGL006003	275	388,0	350,0	F	Golf Lleó	110	2007.05.07	no	no	si
HDGL008004	276	385,2	347,4	F	Xavu (42º 51.36/ 3º 58.44)	270	2007.10.24	no	no	si
HDGL008006	264	374,6	335,8	F	Xavu (42º 51.36/ 3º 58.44)	270	2007.10.24	no	no	si
HDGL008007	320	670,0	601,6	F	Xavu (42º 51.36/ 3º 58.44)	270	2007.10.24	no	no	si
HDGL008008	270	365,0	332,9	F	Xavu (42º 51.36/ 3º 58.44)	270	2007.10.24	no	no	si
HDGL008010	292	459,1	412,5	F	Xavu (42º 51.36/ 3º 58.44)	270	2007.10.24	no	no	si
HDGL008011	280	414,5	369,1	F	Xavu (42º 51.36/ 3º 58.44)	270	2007.10.24	no	no	si
HDGL008012	265	384,0	343,9	F	Xavu (42º 51.36/ 3º 58.44)	270	2007.10.24	no	no	si
HDGL008013	243	292,3	262,8	F	Xavu (42º 51.36/ 3º 58.44)	270	2007.10.24	no	no	si

Exemplar	LTmm	PTgr	PEgr	sexe	posició	profunditat	data	Gen	Morfo	Repro
HDGL008014	290	439,9	406,9	F	Xavu (42° 51.36/ 3° 58.44)	270	2007.10.24	no	no	si
HDGL009001	312	489,0	454,0	F	Golf Lleó		2007.11.30	no	no	si
HDGL009003	331	665,0	596,0	F	Golf Lleó		2007.11.30	no	no	si
HDGL009005	345	690,0	634,0	F	Golf Lleó		2007.11.30	no	no	si
HDGL010002	274	379,0	345,0	F	Golf Lleó		2007.12.12	no	no	si
HDGL010003	270	370,0	331,0	F	Golf Lleó		2007.12.12	no	no	si
HDGL010004	262	320,0	272,0	F	Golf Lleó		2007.12.12	no	no	si
HDGL010006	270	349,0	311,5	F	Golf Lleó		2007.12.12	no	no	si
HDGL011001	285	409,0	371,0	F	Golf Lleó		2007.12.18	no	no	si
HDGL011003	266	335,0	310,0	F	Golf Lleó		2007.12.18	no	no	si
HDGL011005	272	364,0	332,0	F	Golf Lleó		2007.12.18	no	no	si
HDGL011006	278	348,0	313,0	F	Golf Lleó		2007.12.18	no	no	si
HDGL017002	217	160,9	143,3	F			2007.12.27	no	no	si
HDGL017003	212	162,5	144,1	F			2007.12.27	no	no	si
HDGL017004	242	228,0	205,6	F			2007.12.27	no	no	si
HDGL017006	183	100,0	92,9	F			2007.12.27	no	no	si
HDGL017008	224	190,0	173,0	F			2007.12.27	no	no	si
HDGL017010	239	215,9	199,4	F			2007.12.27	no	no	si
HDGL017013	234	229,9	207,7	F			2007.12.27	no	no	si
HDGL017014	243	205,9	193,4	F			2007.12.27	no	no	si
HDGL017016	222	178,9	168,2	F			2007.12.27	no	no	si
HDGL017017	187	106,3	96,5	F			2007.12.27	no	no	si
HDGL018001	210	124,4	113,5	F			2008.01.02	no	no	si
HDGL018002	202	130,8	125,6	F			2008.01.02	no	no	si
HDGL018005	199	95,7	90,0	F			2008.01.02	no	no	si
HDGL018006	204	102,6	95,4	F			2008.01.02	no	no	si
HDGL019001	293	400,2	355,0	F			2008.01.04	no	no	si
HDGL019003	288	341,8	308,0	F			2008.01.04	no	no	si
HDGL019004	262	270,0	251,1	F			2008.01.04	no	no	si
HDGL019005	241	241,2	187,7	F			2008.01.04	no	no	si
HDGL019006	251	275,6	248,7	F			2008.01.04	no	no	si
HDGL019007	238	233,4	211,1	F			2008.01.04	no	no	si
HDGL019008	266	284,9	260,0	F			2008.01.04	no	no	si
HDGL012001	330	621,3	571,5	F	Golf Lleó		2008.01.10	no	no	si
HDGL012003	280	352,7	331,5	F	Golf Lleó		2008.01.10	no	no	si

Exemplar	LTmm	PTgr	PEgr	sexe	posició	profunditat	data	Gen	Morfo	Repro
HDGL020005	288	375,0	331,0	F			2008.01.11	no	no	si
HDGL020006	241	204,7	188,5	F			2008.01.11	no	no	si
HDGL020008	228	184,7	167,1	F			2008.01.11	no	no	si
HDGL020009	232	190,8	176,1	F			2008.01.11	no	no	si
HDGL020010	239	220,0	192,8	F			2008.01.11	no	no	si
HDGL013003	263	345,0	325,0	F	Golf Lleó		2008.01.15	no	no	si
HDGL013004	308	471,0	417,0	F	Golf Lleó		2008.01.15	no	no	si
HDGL013005	331	600,0	544,0	F	Golf Lleó		2008.01.15	no	no	si
HDGL013006	258	342,0	298,0	F	Golf Lleó		2008.01.15	no	no	si
HDGL013008	311	520,0	460,0	F	Golf Lleó		2008.01.15	no	no	si
HDGL013009	281	345,0	307,0	F	Golf Lleó		2008.01.15	no	no	si
HDGL013010	252	286,0	253,0	F	Golf Lleó		2008.01.15	no	no	si
HDGL014003	240	240,5	215,5	F	Golf Lleó		2008.01.17	no	no	si
HDGL014004	268	349,5	318,5	F	Golf Lleó		2008.01.17	no	no	si
HDGL014006	291	431,5	375,5	F	Golf Lleó		2008.01.17	no	no	si
HDGL014007	275	340,0	309,5	F	Golf Lleó		2008.01.17	no	no	si
HDGL014008	261	340,0	308,5	F	Golf Lleó		2008.01.17	no	no	si
HDGL014010	288	415,0	377,0	F	Golf Lleó		2008.01.17	no	no	si
HDGL014011	300	560,0	496,5	F	Golf Lleó		2008.01.17	no	no	si
HDGL015005	308	427,0	392,0	F	Putxet	360	2008.01.24	no	no	si
HDGL015008	284	319,0	293,0	F	Putxet	360	2008.01.24	no	no	si
HDGL015010	295	339,0	309,0	F	Putxet	360	2008.01.24	no	no	si
HDGL015013	284	373,0	328,0	F	Candeleró. Cap de Begur	145	2008.01.24	no	no	si
HDGL015016	310	524,0	439,0	F	Candeleró. Cap de Begur	145	2008.01.24	no	no	si
HDGL021008	253	279,1	252,9	F			2008.01.29	no	no	si
HDGL021009	246	210,3	196,6	F			2008.01.29	no	no	si
HDGL021010	244	255,9	228,5	F			2008.01.29	no	no	si
HDGL016002	268	313,0	280,0	F	Els Clots	550-625	2008.02.06	no	no	si
HDGL016003	281	343,0	363,0	F	Els Clots	550-625	2008.02.06	no	no	si
HDGL016006	274	297,0	276,0	F	Els Clots	550-625	2008.02.06	no	no	si
HDGL022001	208	132,0	122,9	F			2008.02.08	no	no	si
HDGL022005	163	63,8	58,3	F			2008.02.08	no	no	si
HDGL022006	180	83,9	74,6	F			2008.02.08	no	no	si
HDGL022007	238	197,7	182,1	F			2008.02.08	no	no	si
HDGL022009	205	142,4	133,3	F			2008.02.08	no	no	si

Exemplar	LTmm	PTgr	PEgr	sexe	posició	profunditat	data	Gen	Morfo	Repro
HDGL022013	229	183,8	175,0	F			2008.02.08	no	no	si
HDGL022015	191	89,0	82,7	F			2008.02.08	no	no	si
HDGL022016	215	165,0	148,4	F			2008.02.08	no	no	si
HDGL023001	280	375,0	341,5	F			2008.02.14	no	no	si
HDGL023002	280	331,0	301,5	F			2008.02.14	no	no	si
HDGL023003	273	321,5	293,0	F			2008.02.14	no	no	si
HDGL023004	260	250,0	229,0	F			2008.02.14	no	no	si
HDGL023005	289	348,0	325,0	F			2008.02.14	no	no	si
HDGL023007	251	236,0	213,0	F			2008.02.14	no	no	si
HDGL024001	272	354,5	308,5	F			2008.02.21	no	no	si
HDGL024003	260	310,0	277,0	F			2008.02.21	no	no	si
HDGL024004	260	308,5	264,0	F			2008.02.21	no	no	si
HDGL024005	268	362,0	307,5	F			2008.02.21	no	no	si
HDGL024006	273	400,0	334,0	F			2008.02.21	no	no	si
HDGL024007	270	360,5	308,0	F			2008.02.21	no	no	si
HDGL024008	270	350,0	318,5	F			2008.02.21	no	no	si
HDGL024009	251	251,5	225,5	F			2008.02.21	no	no	si
HDGL024010	269	333,0	298,5	F			2008.02.21	no	no	si
HDGL024011	255	276,0	251,5	F			2008.02.21	no	no	si
HDGL024012	251	240,0	213,0	F			2008.02.21	no	no	si
HDGL024013	263	290,0	264,0	F			2008.02.21	no	no	si
HDGL024014	285	375,0	341,5	F			2008.02.21	no	no	si
HDGL024015	253	263,5	240,0	F			2008.02.21	no	no	si
HDGL024016	240	239,0	217,0	F			2008.02.21	no	no	si
HDGL024017	260	270,0	237,5	F			2008.02.21	no	no	si
HDGL034002	231	229,0	202,4	F			2008.02.21			
HDGL034003	283	353,0	319,8	F			2008.02.21			
HDGL034005	257	253,2	227,6	F			2008.02.21			
HDGL034006	293	432,2	385,5	F			2008.02.21			
HDGL034008	270	38,4	290,8	F			2008.02.21			
HDGL034010	266	283,9	258,1	F			2008.02.21			
HDGL034013	252	254,7	220,9	F			2008.02.21			
HDGL025005	300	513,0	455,0	F	10 milles de la costa	140	2008.02.27	no	no	si
HDGL025006	305	555,0	481,0	F	10 milles de la costa	140	2008.02.27	no	no	si
HDGL025010	300	538,0	457,0	F	10 milles de la costa	140	2008.02.27	no	no	si

Exemplar	LTmm	PTgr	PEgr	sexe	posició	profunditat	data	Gen	Morfo	Repro
HDGL025011	310	553,0	484,0	F	10 milles de la costa	140	2008.02.27	no	no	si
HDGL025012	302	494,0	429,0	F	10 milles de la costa	140	2008.02.27	no	no	si
HDGL025013	264	345,0	299,0	F	10 milles de la costa	140	2008.02.27	no	no	si
HDGL025016	305	536,0	451,0	F	10 milles de la costa	140	2008.02.27	no	no	si
HDGL025018	281	460,0	380,0	F	10 milles de la costa	140	2008.02.27	no	no	si
HDGL025019	298	476,0	416,0	F	10 milles de la costa	140	2008.02.27	no	no	si
HDGL025020	308	466,0	429,0	F	10 milles de la costa	140	2008.02.27	no	no	si
HDGL025022	295	407,0	358,0	F	10 milles de la costa	140	2008.02.27	no	no	si
HDGL025024	278	428,0	380,0	F	10 milles de la costa	140	2008.02.27	no	no	si
HDGL027004	274	362,0	314,0	F			2008.03.14	no	no	si
HDGL027005	272	352,0	307,0	F			2008.03.14	no	no	si
HDGL027009	365	844,0	729,0	F			2008.03.14	no	no	si
HDGL027010	302	525,0	440,0	F			2008.03.14	no	no	si
HDGL027011	313	589,0	509,0	F			2008.03.14	no	no	si
HDGL028006	302	436,0	373,0	F			2008.04.02	no	no	si
HDGL028007	272	343,0	296,0	F			2008.04.02	no	no	si
HDGL029001	302	512,0	450,0	F			2008.04.09	no	no	si
HDGL029002	256	362,0	333,0	F			2008.04.09	no	no	si
HDGL029003	314	512,0	460,0	F			2008.04.09	no	no	si
HDGL029004	268	313,0	279,0	F			2008.04.09	no	no	si
HDGL029007	280	414,0	371,0	F			2008.04.09	no	no	si
HDGL030001	292	437,2	393,8	F			2008.04.23	no	no	si
HDGL030006	281	349,5	318,5	F			2008.04.23	no	no	si
HDGL030008	294	408,3	375,3	F			2008.04.23	no	no	si
HDGL030009	288	365,6	324,7	F			2008.04.23	no	no	si
HDGL030011	279	408,4	353,8	F			2008.04.23	no	no	si
HDGL005002	265	360,0	312,4	F	Tossa	110	ABRIL	no	no	si
HDGL005003	265	344,4	308,7	F	Tossa	110	ABRIL	no	no	si
HDGL030012	292	429,4	389,5	F			2008.04.23	no	no	si
HDGL031001	256	284,0	249,0	F			2008.05.06	no	no	si
HDGL031004	300	503,0	360,0	F			2008.05.06	no	no	si
HDGL032002	337	694,4	605,7	F			2008.05.08	no	no	si
HDGL032003	315	492,3	439,0	F			2008.05.08	no	no	si
HDGL032008	333	576,1	523,0	F			2008.05.08	no	no	si
HDGL033001	357	738,0	685,0	F			2008.05.20	no	no	si

Exemplar	LTmm	PTgr	PEgr	sexe	posició	profunditat	data	Gen	Morfo	Repro
HDGL033002	328	623,0	567,0	F			2008.05.20	no	no	si
HDGL033004	350	753,0	688,0	F			2008.05.20	no	no	si
HDGL033005	318	591,0	539,0	F			2008.05.20	no	no	si
HDGL033006	317	678,0	602,0	F			2008.05.20	no	no	si
HDGL033007	351	742,0	673,0	F			2008.05.20	no	no	si
HDGL033008	330	584,0	542,0	F			2008.05.20	no	no	si
HDGL035006	252	315,0	285,0	F			2008.07.29	no	no	si
HDGL035010	257	287,0	264,0	F			2008.07.29	no	no	si
HDGL007001	313	726,4	651,2	F			agost	no	no	si
HDGL007003	240	267,4	246,2	F			agost	no	no	si
HDGL036001	248	251,0	233,0	F			2008.09.29	no	no	si
HDGL036002	233	230,0	213,0	F			2008.09.29	no	no	si
HDGL036003	253	307,0	280,0	F			2008.09.29	no	no	si
HDGL036005	215	178,0	164,0	F			2008.09.29	no	no	si
HDGL036006	247	255,0	235,0	F			2008.09.29	no	no	si
HDGL036007	253	277,0	250,0	F			2008.09.29	no	no	si
HDGL036008	249	268,0	248,0	F			2008.09.29	no	no	si
HDGL036009	254	311,0	288,0	F			2008.09.29	no	no	si
HDGL036010	234	237,0	219,0	F			2008.09.29	no	no	si
Individu	LT (mm)	Pt (gr)	Pe (gr)	Sexe	Pes gónada (gr)	Pfetge (gr)	LS (mm)	LpA (mm)	Greix	
HD 030202	256	293,6	270,8	F	6,3117	2,6132	209	137	0	
HD 030205	222	170,6	162,4	F	6,7058	1,5783	187	115	0,0548	
HD 030206	270	360,5	324,4	F	14,1506	5,7803	228	149	0,5851	
HD 030207	235	295,4	261,2	F	8,9439	3,84	189	127	0,024	
HD 030208	223	214,3	192,2	F	5,9726	2,503	184	115	0,0182	
HD 030209	221	223,5	200,3	F	7,6482	3,7279	179	110	0,3287	
HD 030210	237	279,1	234	F	17,3298	0,8846	190	123	1,3568	
HD 030301	263	278,9	246,2	F	6,2319	2,7209	213	141	0	
HD 030302	220	202,2	187,9	F	5,7402	0,5788	179	108	0	
HD 030304	249	294,8	276,3	F	1,5655	1,3672	199	127	0,1976	
HD 030305	221	204,9	173,3	F	6,0523	1,3181	178	133	0,0142	
HD 030306	259	320	241,9	F	0	0,6511	213	134	0	
HD 030307	220	200,7	175	F	7,2896	1,2958	177	109	0	
HD 030308	213	221,5	198,3	F	7,8115	1,6758	172	116	0	

Individu	LT (mm)	Pt (gr)	Pe (gr)	Sexe	Pes gónada (gr)	Pfetge (gr)	LS (mm)	LpA (mm)	Greix	
HD 030402	235	261,9	226,5	F	1,3584	5,4081	197	127	0,1594	
HD 030403	277	354,1	325,4	F	3,3812	10,1164	224	149	0,9438	
HD 030404	254	298,8	267,7	F	2,5023	7,5157	209	137	0,4433	
HD 030405	247	286,2	218,1	F	2,3387	6,7809	201	134	0,2909	
HD 030604	227	271,2	198,7	F	1,8834	1,92	187	126	0	
HD 030604	227	271,2	198,7	F	1,8834	1,92	187	126		
HD 031101	236	250	226	F	0,7974	1,514	189	118	0	
HD 040101	192	112,5		F	3,5874	1,2773	152	102		
HD 040102	192	126,7		F	7,4238	1,3142	153	94	0,3182	
HD 040105	243	282,1	250,2	F	10,8029	6,1634	196	127	0,4133	
HD 040201	233	271,1	240	F	12,5326	3,5658	194	131		
HD 040204	186	57,6	41,7	F	2,6816	1,2374	159	90,2	0	
HD 040206	232	186,5	117,2	F	6,6318	3,1466	187	119	0	
HD 041104	235	235,1	210,6	F	0,4321	1,9654	191	115	0	
HD 041105	269	361,4	341,2	F	0,6123	1,9765	211	132	0	
HD 041201	275	424,8	382,6	F	1,1736	10,4262	217	137	0	
HD 041203	207	168,2	157,5	F	0,2343	1,3529	163	101		
HD 041204	290	461,1	427,8	F	1,1429	7,002	227	147	0,6584	
HD 050502	200	187,8	171,6	F	1,5224	3,2581	158	98		
HD 050504	167	111,7	100,5	F	1,4286	3,6269	129	82		
HD 050606	242	245,1	198,2	F	1,7054	2,876	203	127	Molt	
HD 050607	188	196,3	171,3	F	0,7408	2,3021	149	93	Molt	
HD 050801	219	221,7	202,5	F	0,2071	2,7564	176	112	0,8568	
HD 050803	229	232,4	209,8	Fimm	0,8527	4,3906	183	113	0,9515	
HD 050804	201	201,6	179,6	Fimm	0,3011	3,2596	170	101	1,0327	
HD 050806	184	186,4	165,8	Fimm	0,2136	2,3748	149	85	0,8673	
HD 050901	191	193,5		F	1,486	1,615	157	91		
HD 050903	211	213,7		Fimm	0,765	1,3421	173	109		
HD 050907	167	159,7	136,7	Fimm	0,653	0,9873	135	78		
HD 050909	162	163,5	145,8	F	0,8765	1,1321	129	72		
HD 051002	181	103,9	89,7	F	1,0832	2,2282	142	81	0,5277	
HD 051005	171	105,6	85,9	F	1,3254	1,931	134	79	0,1823	
HD 051006	161	97,9	78,3	F	1,2239	1,469	139	75	0,1553	
HD 060101	227	238,4	221,6	F			183	118		
HD 060103	187	136,8	127,9	F			150	89		

Individu	LT (mm)	Pt (gr)	Pe (gr)	Sexe	Pes gónada (gr)	Pfetge (gr)	LS (mm)	LpA (mm)	Greix	
HD 060201	213	202,4	185,4	F	7,865	2,976	172	103	MOLT	
HD 060203	190	157,5	140	F	3,6585	2,6538	161	93	MOLT	
HD 060205	297	509,9	462,6	F	10,3303	4,813	249	149	MOLT	
HD 060303	265	279,8	248,5	F	7,9659	2,7209	220	139	MOLT	
HD 060305	397	1567,4	1504,9	F		41,345	347	220	MOLT	
HD 060307	261	447,3	363,7	F	48,3832	12,101	219	143	MOLT	
HD 060308	301	638,8	508,8	F	48,081	13,6637	251	159	MOLT	
HD 060309	271	456,8	422	F	20,6282	12,8708	226	140	MOLT	

MASCLES										
Exemplar	LTmm	PTgr	PEgr	sexe	posició	profunditat	data	Gen	Morfo	Repro
HDGL001003	265	357,7	327,9	M	Seta (42º 43.85/ 3º 39.63)	160-180	2007.01.22	no	no	si
HDGL001005	265	353,7	327,3	M	Seta (42º 43.85/ 3º 39.63)	160-180	2007.01.22	no	no	si
HDGL001007	284	435,1	405,9	M	Seta (42º 43.85/ 3º 39.63)	160-180	2007.01.22	no	no	si
HDGL001008	284	464,0	428,8	M	Seta (42º 43.85/ 3º 39.63)	160-180	2007.01.22	no	no	si
HDGL001011	283	423,6	396,1	M	Seta (42º 43.85/ 3º 39.63)	160-180	2007.01.22	no	no	si
HDGL001012	250	288,2	370,2	M	Seta (42º 43.85/ 3º 39.63)	160-180	2007.01.22	no	no	si
HDGL001017	271	404,2	372,0	M	Seta (42º 43.85/ 3º 39.63)	160-180	2007.01.22	no	no	si
HDGL003004	250	268,3	253,4	M	fluviana, fons rocós	180	2007.02.05	no	no	si
HDGL003006	205	167,7	148,0	M	fluviana, fons rocós	180	2007.02.05	no	no	si
HDGL003007	261	386,4	354,7	M	fluviana, fons rocós	180	2007.02.05	no	no	si
HDGL003010	194	130,9	122,3	M	fluviana, fons rocós	180	2007.02.05	no	no	si
HDGL003013	211	136,8	145,9	M	fluviana, fons rocós	180	2007.02.05	no	no	si
HDGL002002	376	903,5	852,2	M	unes 17 milles de Blanes	160	2007.02.22	no	no	si
HDGL002003	327	580,6	540,0	M	unes 17 milles de Blanes	160	2007.02.22	no	no	si
HDGL004002	345	692,7	636,7	M	unes 17 milles de Blanes	140	2007.02.22	no	no	si
HDGL004005	307	486,6	451,5	M	unes 17 milles de Blanes	140	2007.02.23	no	no	si
HDGL004006	326	721,3	666,9	M	unes 17 milles de Blanes	140	2007.02.24	no	no	si
HDGL004007	295	531,8	490,4	M	unes 17 milles de Blanes	140	2007.02.25	no	no	si
HDGL004008	342	834,4	764,4	M	unes 17 milles de Blanes	140	2007.02.26	no	no	si
HDGL006001	241	275,2	249,9	M	Golf Lleó	110	2007.05.07	no	no	si
HDGL008001	270	406,3	374,3	M	Xavu (42º 51.36/ 3º 58.44)	270	2007.10.24	no	no	si
HDGL008002	279	412,8	384,0	M	Xavu (42º 51.36/ 3º 58.44)	270	2007.10.24	no	no	si
HDGL008003	300	488,5	443,4	M	Xavu (42º 51.36/ 3º 58.44)	270	2007.10.24	no	no	si
HDGL008005	287	376,8	347,7	M	Xavu (42º 51.36/ 3º 58.44)	270	2007.10.24	no	no	si
HDGL008009	322	578,2	531,4	M	Xavu (42º 51.36/ 3º 58.44)	270	2007.10.24	no	no	si
HDGL009002	337	569,0	525,0	M	Golf Lleó		2007.11.30	no	no	si
HDGL009004	341	727,0	682,0	M	Golf Lleó		2007.11.30	no	no	si
HDGL009006	377	847,0	792,0	M	Golf Lleó		2007.11.30	no	no	si
HDGL009007	380	853,0	796,0	M	Golf Lleó		2007.11.30	no	no	si
HDGL010001	293	468,5	414,0	M	Golf Lleó		2007.12.12	no	no	si
HDGL010005	300	454,5	426,5	M	Golf Lleó		2007.12.12	no	no	si
HDGL011002	278	341,0	329,0	M	Golf Lleó		2007.12.18	no	no	si
HDGL011004	294	403,0	389,0	M	Golf Lleó		2007.12.18	no	no	si

Exemplar	LTmm	PTgr	PEgr	sexe	posició	profunditat	data	Gen	Morfo	Repro
HDGL017001	208	162,6	142,6	M			2007.12.27	no	no	si
HDGL017005	234	192,4	178,3	M			2007.12.27	no	no	si
HDGL017007	208	140,0	132,7	M			2007.12.27	no	no	si
HDGL017009	228	168,0	159,1	M			2007.12.27	no	no	si
HDGL017011	235	194,2	184,8	M			2007.12.27	no	no	si
HDGL017012	243	223,0	211,7	M			2007.12.27	no	no	si
HDGL017015	240	219,2	196,8	M			2007.12.27	no	no	si
HDGL018003	213	156,3	147,1	M			2008.01.02	no	no	si
HDGL018004	202	114,0	110,2	M			2008.01.02	no	no	si
HDGL019002	274	318,1	301,3	M			2008.01.04	no	no	si
HDGL019009	246	232,5	220,9	M			2008.01.04	no	no	si
HDGL019010	258	260,3	244,9	M			2008.01.04	no	no	si
HDGL012002	278	347,3	337,5	M	Golf Lleó		2008.01.10	no	no	si
HDGL020001	321	537,8	492,0	M			2008.01.11	no	no	si
HDGL020002	360	754,5	713,2	M			2008.01.11	no	no	si
HDGL020003	269	295,9	274,9	M			2008.01.11	no	no	si
HDGL020004	271	313,6	294,0	M			2008.01.11	no	no	si
HDGL020007	276	333,6	315,2	M			2008.01.11	no	no	si
HDGL020011	281	340,7	320,3	M			2008.01.11	no	no	si
HDGL013001	333	564,0	537,0	M	Golf Lleó		2008.01.15	no	no	si
HDGL013002	323	596,0	554,0	M	Golf Lleó		2008.01.15	no	no	si
HDGL013007	254	302,0	283,0	M	Golf Lleó		2008.01.15	no	no	si
HDGL014001	332	583,0	556,0	M	Golf Lleó		2008.01.17	no	no	si
HDGL014002	305	558,5	530,5	M	Golf Lleó		2008.01.17	no	no	si
HDGL014005	272	343,5	325,0	M	Golf Lleó		2008.01.17	no	no	si
HDGL014009	372	916,0	856,0	M	Golf Lleó		2008.01.17	no	no	si
HDGL014012	322	585,0	554,0	M	Golf Lleó		2008.01.17	no	no	si
HDGL015001	304	421,0	409,0	M	Putxet	360	2008.01.24	no	no	si
HDGL015002	281	330,0	310,0	M	Putxet	360	2008.01.24	no	no	si
HDGL015003	289	345,0	330,0	M	Putxet	360	2008.01.24	no	no	si
HDGL015004	277	304,0	289,0	M	Putxet	360	2008.01.24	no	no	si
HDGL015006	323	500,0	480,0	M	Putxet	360	2008.01.24	no	no	si
HDGL015007	292	353,0	338,0	M	Putxet	360	2008.01.24	no	no	si
HDGL015009	285	326,0	308,0	M	Putxet	360	2008.01.24	no	no	si
HDGL015011	303	395,0	369,0	M	Putxet	360	2008.01.24	no	no	si

Exemplar	LTmm	PTgr	PEgr	sexe	posició	profunditat	data	Gen	Morfo	Repro
HDGL015012	290	331,0	315,0	M	Putxet	360	2008.01.24	no	no	si
HDGL015014	285	433,0	401,0	M	Candelerero. Cap de Begur	145	2008.01.24	no	no	si
HDGL015015	277	349,0	321,0	M	Candelerero. Cap de Begur	145	2008.01.24	no	no	si
HDGL021001	272	336,5	310,9	M			2008.01.29	no	no	si
HDGL021002	273	336,0	322,2	M			2008.01.29	no	no	si
HDGL021003	261	324,5	293,8	M			2008.01.29	no	no	si
HDGL021004	273	368,9	312,0	M			2008.01.29	no	no	si
HDGL021005	277	336,8	320,0	M			2008.01.29	no	no	si
HDGL021006	257	250,7	236,1	M			2008.01.29	no	no	si
HDGL021007	272	232,1	303,4	M			2008.01.29	no	no	si
HDGL016001	308	414,0	392,0	M	Els Clots	550-625	2008.02.06	no	no	si
HDGL016004	257	296,0	276,0	M	Els Clots	550-625	2008.02.06	no	no	si
HDGL016005	300	426,0	403,0	M	Els Clots	550-625	2008.02.06	no	no	si
HDGL016007	286	323,0	298,0	M	Els Clots	550-625	2008.02.06	no	no	si
HDGL016008	255	269,0	254,0	M	Els Clots	550-625	2008.02.06	no	no	si
HDGL016009	284	330,0	308,0	M	Els Clots	550-625	2008.02.06	no	no	si
HDGL016010	287	368,0	345,0	M	Els Clots	550-625	2008.02.06	no	no	si
HDGL016011	296	402,0	376,0	M	Els Clots	550-625	2008.02.06	no	no	si
HDGL016012	259	277,0	261,0	M	Els Clots	550-625	2008.02.06	no	no	si
HDGL022002	200	116,2	112,7	M			2008.02.08	no	no	si
HDGL022003	196	118,5	112,0	M			2008.02.08	no	no	si
HDGL022008	235	186,4	175,0	M			2008.02.08	no	no	si
HDGL022010	253	225,5	214,6	M			2008.02.08	no	no	si
HDGL022011	187	93,8	88,5	M			2008.02.08	no	no	si
HDGL022014	261	226,6	211,7	M			2008.02.08	no	no	si
HDGL022017	151	47,2	43,5	M			2008.02.08	no	no	si
HDGL023006	292	384,0	366,0	M			2008.02.14	no	no	si
HDGL024002	260	301,0	275,0	M			2008.02.21	no	no	si
HDGL024018	291	417,0	289,5	M			2008.02.21	no	no	si
HDGL024019	231	180,0	165,0	M			2008.02.21	no	no	si
HDGL024020	265	305,5	283,5	M			2008.02.21	no	no	si
HDGL024021	274	375,5	352,0	M			2008.02.21	no	no	si
HDGL024022	258	288,5	270,5	M			2008.02.21	no	no	si
HDGL024023	278	354,5	332,0	M			2008.02.21	no	no	si
HDGL024024	252	286,5	265,0	M			2008.02.21	no	no	si

Exemplar	LTmm	PTgr	PEgr	sexe	posició	profunditat	data	Gen	Morfo	Repro
HDGL024025	275	321,5	306,5	M			2008.02.21	no	no	si
HDGL024026	283	261,0	335,5	M			2008.02.21	no	no	si
HDGL024027	250	260,0	243,5	M			2008.02.21	no	no	si
HDGL026001	260	254,3	232,4	M			2008.02.21	no	no	si
HDGL026002	234	172,0	161,8	M			2008.02.21	no	no	si
HDGL026003	223	150,7	142,9	M			2008.02.21	no	no	si
HDGL026004	197	106,8	101,2	M			2008.02.21	no	no	si
HDGL026005	208	131,5	120,8	M			2008.02.21	no	no	si
HDGL026006	198	98,3	93,0	M			2008.02.21	no	no	si
HDGL026007	205	114,0	106,6	M			2008.02.21	no	no	si
HDGL026008	176	71,7	68,0	M			2008.02.21	no	no	si
HDGL034001	290	398,8	368,9	M			2008.02.21			
HDGL034004	272	301,7	275,4	M			2008.02.21			
HDGL034007	226	180,2	170,0	M			2008.02.21			
HDGL034009	265	307,0	285,3	M			2008.02.21			
HDGL034011	276	333,4	310,2	M			2008.02.21			
HDGL034012	260	290,7	259,1	M			2008.02.21			
HDGL034014	238	197,1	180,8	M			2008.02.21			
HDGL034015	267	295,0	274,1	M			2008.02.21			
HDGL034016	255	273,6	255,2	M			2008.02.21			
HDGL025001	310	694,0	639,0	M	10 milles de la costa	140	2008.02.27	no	no	si
HDGL025002	295	558,0	526,0	M	10 milles de la costa	140	2008.02.27	no	no	si
HDGL025003	288	559,0	507,0	M	10 milles de la costa	140	2008.02.27	no	no	si
HDGL025004	307	638,0	584,0	M	10 milles de la costa	140	2008.02.27	no	no	si
HDGL025007	309	534,0	494,0	M	10 milles de la costa	140	2008.02.27	no	no	si
HDGL025008	321	599,0	551,0	M	10 milles de la costa	140	2008.02.27	no	no	si
HDGL025009	299	466,0	430,0	M	10 milles de la costa	140	2008.02.27	no	no	si
HDGL025014	318	541,0	510,0	M	10 milles de la costa	140	2008.02.27	no	no	si
HDGL025015	299	476,0	442,0	M	10 milles de la costa	140	2008.02.27	no	no	si
HDGL025017	329	555,0	518,0	M	10 milles de la costa	140	2008.02.27	no	no	si
HDGL025021	296	482,0	450,0	M	10 milles de la costa	140	2008.02.27	no	no	si
HDGL025023	294	465,0	429,0	M	10 milles de la costa	140	2008.02.27	no	no	si
HDGL027001	307	515,0	480,0	M			2008.03.14	no	no	si
HDGL027002	351	720,0	667,0	M			2008.03.14	no	no	si
HDGL027003	335	642,0	599,0	M			2008.03.14	no	no	si

Exemplar	LTmm	PTgr	PEgr	sexe	posició	profunditat	data	Gen	Morfo	Repro
HDGL027006	281	345,0	323,0	M			2008.03.14	no	no	si
HDGL027007	290	415,0	383,0	M			2008.03.14	no	no	si
HDGL027008	308	518,0	477,0	M			2008.03.14	no	no	si
HDGL027012	312	573,0	527,0	M			2008.03.14	no	no	si
HDGL028001	301	515,0	463,0	M			2008.04.02	no	no	si
HDGL028002	287	386,0	352,0	M			2008.04.02	no	no	si
HDGL028003	280	359,0	334,0	M			2008.04.02	no	no	si
HDGL028004	276	330,0	300,0	M			2008.04.02	no	no	si
HDGL028005	308	415,0	381,0	M			2008.04.02	no	no	si
HDGL029005	294	475,0	434,0	M			2008.04.09	no	no	si
HDGL029006	298	476,0	438,0	M			2008.04.09	no	no	si
HDGL030002	303	462,2	432,6	M			2008.04.23	no	no	si
HDGL030003	315	476,2	451,6	M			2008.04.23	no	no	si
HDGL030004	286	424,4	401,0	M			2008.04.23	no	no	si
HDGL030005	285	399,4	371,9	M			2008.04.23	no	no	si
HDGL030007	293	457,1	434,0	M			2008.04.23	no	no	si
HDGL005001	307	598,0	556,9	M	Tossa	110	ABRIL	no	no	si
HDGL030010	283	426,5	392,2	M			2008.04.23	no	no	si
HDGL031002	257	294,0	272,0	M			2008.05.06	no	no	si
HDGL031003	300	478,0	450,0	M			2008.05.06	no	no	si
HDGL031005	248	247,0	223,0	M			2008.05.06	no	no	si
HDGL032001	341	679,0	632,9	M			2008.05.08	no	no	si
HDGL032004	318	537,0	494,7	M			2008.05.08	no	no	si
HDGL032005	308	478,0	444,5	M			2008.05.08	no	no	si
HDGL032006	320	618,0	572,6	M			2008.05.08	no	no	si
HDGL032007	350	693,2	650,3	M			2008.05.08	no	no	si
HDGL033003	316	574,0	536,0	M			2008.05.20	no	no	si
HDGL035001	294	367,0	339,0	M			2008.07.29	no	no	si
HDGL035002	299	391,0	383,0	M			2008.07.29	no	no	si
HDGL035003	283	391,0	360,0	M			2008.07.29	no	no	si
HDGL035004	286	382,0	354,0	M			2008.07.29	no	no	si
HDGL035005	286	373,0	346,0	M			2008.07.29	no	no	si
HDGL035007	287	361,0	332,0	M			2008.07.29	no	no	si
HDGL035008	290	412,0	381,0	M			2008.07.29	no	no	si
HDGL035009	270	334,0	310,0	M			2008.07.29	no	no	si

Exemplar	LTmm	PTgr	PEgr	sexe	posició	profunditat	data	Gen	Morfo	Repro
HDGL007002	193	185,1	171,5	M			agost	no	no	si
HDGL036004	227	216,0	201,0	M			2008.09.29	no	no	si
Individu	LT (mm)	Pt (gr)	Pe (gr)	Sexe	Pes gónada (gr)	Pfetge (gr)	LS (mm)	LpA (mm)	Greix (gr)	
HD 030201	275	424,1	402,1	M	0,3423	4,1668	228	143	1,6537	
HD 030204	260	307,1	278,3	M	0,2614	2,2717	217	134	0,1297	
HD 030303	247	247,1	234,5	M	0,1485	1,4087	200	127	0,2795	
HD 030401	230	220,7	191,9	M	0,1693	3,2415	187	125	0,233	
HD 030406	222	209,5	172,5	M	0,2166	2,9316	181	118	0,0817	
HD 030407	251	302,7	285,5	M	0,3824	4,8284	206	137	0,8504	
HD 030408	216	181,3	165,3	M	0,2473	2,6004	179	112	0,1223	
HD 030601	270	401,7	338,9	M	0,0893	2,1999	223	144		
HD 030601	270	401,7	338,9	M	0,0893	2,1999	223	144	0,4287	
HD 030602	279	374	320,5	M	0,578	1,4472	221	148		
HD 030602	279	374	320,5	M	0,578	1,4472	221	148	0,1358	
HD 030603	256	267,7	238,9	M	0,813	1,4697	205	139		
HD 030603	256	267,7	238,9	M	0,813	1,4697	205	139	0,1924	
HD 030605	223	230	198,8	M	0,3747	0,463	179	117		
HD 030605	223	230	198,8	M	0,3747	0,463	179	117	1,2349	
HD 030701	236	189,2	151,7	M	0,8645	0,42	193	122		
HD 030702	246	299,7	272,9	M	0,7219	2,3945	201	123	0,4328	
HD 031104	213	198,8	173,3	M	0,2422	0,9704	170	107	0,5424	
HD 040103	286	344,7	325,6	M	0,2036	3,5123	239	154	0,7138	
HD 040104	231	144,8	242,5	M	0,1961	1,5715	193	122	0,168	
HD 040202	284	386,3	375,8	M	0,2914	3,4245	243	152	0,184	
HD 040203	235	145,2	80,1	M	0,0425	2,3731	193	122	0,1321	
HD 040205	234	103	86,6	M	0,1074	2,2571	194	127		
HD 041101	269	305,7	278,6	M	0,0532	3,4213	219	138		
HD 041102	273	306,8	280,5	M	0,0764	3,6432	220	138		
HD 041103	253	258	235,3	M	0,0432	3,2983	205	127		
HD 041202	247	288,9	267,8	M	0,0761	2,2536	195	123		
HD 041205	304	513,4	465,2	M	0,3104	2,6142	239	154		
HD 050501	182	131,5	116,6	M	0,1141	1,8563	142	87		

Individu	LT (mm)	Pt (gr)	Pe (gr)	Sexe	Pes gónada (gr)	Pfetge (gr)	LS (mm)	LpA (mm)	Greix (gr)	
HD 050503	220	246,9	240,8	M	0,3711	4,8261	172	104		
HD 050605	227	235,5	213,7	M	0,3863	1,323	193	115	Molt	
HD 050802	252	267,9	243,7	M	1,3179	1,4697	205	114	0,7794	
HD 050805	265	276,8	254,3	M	3,404	3,1098	217	128	3,6051	
HD 050808	151	147,7	119,1	M	0,1012	0,5296	123	69	0,5321	
HD 050902	200	216,7		M	0,276	1,5573	159	93		
HD 050904	260	265,5	243,9	M	0,786	1,9872	210	129		
HD 050905	191	195,8	169,9	M	0,342	1,6523	155	91		
HD 050906	200	206,2	187,3	M	0,312	1,6482	162	93		
HD 050908	181	186,5	175,5	M	0,3112	1,4376	148	83		
HD 051001	192	205,5	192,9	M	0,5453	6,1221	159	87	2,1181	
HD 051003	192	133,5	117,9	M	0,8643	4,0784	160	82	1,6854	
HD 051004	247	247,4	223,9	M	2,2353	6,1644	207	121	1,4	
HD 051007	179	117,1	102,5	M	1,0876	2,6445	142	79	0,8754	
HD 060102	213	187,2		M			167	100		
HD 060202	205	163,1	138,5	M	0,174	1,489	169	98		
HD 060204	191	174,3	157,4	M	desfeta	2,5036	157	94		
HD 060301	291	372,5	351,2	M	0,1693	1,2539	250	157	MOLT	
HD 060302	244	247,1	234,5	M	0,1485	1,4087	204	132	MOLT	
HD 060304	396	1529,3	1487,6	M		32,579	348	214	MOLT	
HD 060306	387	1542,8	1513,2	M		31,243	331	200	MOLT	