

**Títol del treball:** Anàlisi volumètrica dels estadis de desenvolupament oocitari en *Molva macrophthalma* i *M. dypterygia*

---

Estudiant: Júlia Ferrer Morell

Grau en Biologia

Correu electrònic: u1928628@campus.udg.edu

Tutor: Marta Muñoz Frigola

Cotutor\*:

Empresa / institució: Grup de Recerca de Biodiversitat i Recursos marins de la Universitat de Girona

Vistiplau tutor (i cotutor\*):

Nom del tutor: Marta Muñoz Frigola

Nom del cotutor\*:

Empresa / institució: Grup de Recerca de Biodiversitat i Recursos marins de la Universitat de Girona

Correu(s) electrònic(s): marta.munyo@udg.edu

\*si hi ha un cotutor assignat

Data de dipòsit de la memòria a secretaria de coordinació: 13/02/2018

## AGRAÏMENTS:

En primer lloc vull donar gràcies a la Dra. Marta Muñoz per haver-me proposat un tema tan interessant com aquest, per la seva paciència a l'hora de solucionar certs entrebancs i revisar el meu treball i pels seus ànims en tot moment. Aquest Treball de Fi de Grau m'ha permès adquirir nous coneixements i aprendre una tècnica molt innovadora que espero poder tornar a aplicar en un futur pròxim.

Vull agrair a l'Alba Serrat que m'hagi permès ajudar-la en la seva tesi doctoral i la seva dedicació al laboratori a l'hora d'ensenyar-me el funcionament de programes d'anàlisi d'imatges o de la tècnica de l'"Ovarian Packing Density", cosa que m'ha fet aprofundir més en aquest apassionant món.

També vull donar gràcies a en Carles Tobella per destinar hores de la seva feina a solucionar els dubtes i problemes estadístics que m'han anat sorgint, per ensenyar-me noves anàlisis i pel seu gran suport i entusiasme al llarg d'aquest treball.

Finalment vull agrair a la meva família i als meus amics els seus ànims, els quals han aguantat els meus nervis en els pitjors moments i han mostrat interès cap aquest treball.

Moltes gràcies a tots, de tot cor.

## RESUM:

En el present Treball de Fi de Grau s'analitza la volumetria dels estadis de desenvolupament oocitari en *Molva macrophthalma*, una espècie d'aigües fredes que es troba a la zona nord-occidental del Mar Mediterrani. També s'ha realitzat el mateix estudi en una espècie filogenèticament molt propera, *Molva dypterygia*, la qual es distribueix per nord-est de l'Oceà Atlàntic i part de l'Oceà Àrtic, per tal de poder-les comparar. La metodologia utilitzada es basa en l'anàlisi d'imatges i, més concretament, en l'"Ovarian Packing Density" o OPD. El qual, segons el Principi de Delesse que afirma que la fracció de volum dels oòcits és proporcional a la seva àrea de secció transversal i el càlcul del seu diàmetre, permet determinar el nombre d'oòcits per gram d'ovari.

Els resultats demostren que el volum oocitari en ambdues espècies augmenta a mesura que es van desenvolupant els oòcits, tal com és lògic. També s'ha observat que *Molva macrophthalma* disposa d'uns oòcits en estadi de cromatina-nucleolar i d'alvèols corticals amb major volum que *Molva dypterygia*, ja que principalment habita en el Golf de Lleó, una zona d'elevada productivitat que li permet tenir més recursos disponibles per a dedicar a les despeses relacionades amb la reproducció. Cal, però indicar que el nombre d'oòcits per gram d'ovari és menor en l'espècie mediterrània. Així doncs, les condicions favorables en què es troba *Molva macrophthalma* li permeten desenvolupar ous de més qualitat que l'espècie atlàntica, però això també implica que en pot desenvolupar menys quantitat.

A més a més, s'ha detectat que la durada de l'època de posta de *Molva dypterygia* és més curta que la de *Molva macrophthalma*, fent que desenvolupi el reservori d'oòcits en estadi d'alvèols corticals de manera sincrònica per poder alliberar-los en aquest breu període, mentre que l'espècie mediterrània desenvolupa una gran varietat d'oòcits de manera continuada, els quals alliberarà en diverses postes durant un període més llarg.

Els resultats obtinguts concorden amb la hipòtesi que les condicions de l'hàbitat on es troben influeixen en l'adquisició de recursos que posteriorment seran transformats en energia per desenvolupar les seves gònades. A més de la productivitat del medi, la temperatura també pot afectar la biologia d'aquestes espècies, avançant o retardant el període de posta, modificant la seva durada i alterant l'estratègia reproductiva.

## RESUMEN:

En el presente Trabajo de Fin de Grado se analiza la volumetría de los estadios de desarrollo oocitario en *Molva macrophthalma*, una especie de aguas frías que se encuentra en la zona noroccidental del Mar Mediterráneo. También se ha realizado el mismo estudio en una especie filogenéticamente muy cercana, *Molva dypterygia*, la cual se distribuye por el noreste del Océano Atlántico y parte del Océano Ártico, para poderlas comparar. La metodología utilizada se basa en el análisis de imágenes y, más concretamente, en el “Ovarian Packing Density” o OPD. El cual, según el Principio de Delesse que afirma que la fracción de volumen de los oocitos es proporcional a su área de sección transversal y el cálculo de su diámetro, permite determinar el número de oocitos por gramo de ovario.

Los resultados demuestran que el volumen oocitario en ambas especies aumenta a medida que se van desarrollando los oocitos, tal y como es lógico. También se ha observado que *Molva macrophthalma* dispone de unos oocitos en estadio de cromatina-nucleolar y de alveolos corticales de mayor volumen que *Molva dypterygia*, puesto que principalmente habita en el Golfo de León, una zona de elevada productividad que le permite tener más recursos disponibles para dedicar a los gastos relacionados con la reproducción. Hace falta, pero indicar que el número de oocitos por gramo de ovario es menor en la especie mediterránea. Así pues, las condiciones favorables en las que se encuentra *Molva macrophthalma* le permiten desarrollar huevos de más calidad que la especie atlántica, pero esto también implica que puede desarrollarlos en menos cantidad.

Además, se ha detectado que la duración de la época de desove de *Molva dypterygia* es más corta que la de *Molva macrophthalma*, haciendo que desarrolle el reservorio de oocitos en estadio de alveolos corticales de manera sincrónica para poder liberarlos en este breve periodo, mientras que la especie mediterránea desarrolla una gran variedad de oocitos de manera continuada, los cuales liberará en varias postas durante un periodo más largo.

Los resultados obtenidos concuerdan con la hipótesis que las condiciones del hábitat donde se encuentran influyen en la adquisición de recursos que posteriormente serán transformados en energía para desarrollar sus gónadas. Además de la productividad del medio, la temperatura también puede afectar la biología de estas especies, avanzando o retrasando el periodo de desove, modificando su duración y alterando la estrategia reproductiva.

**ABSTRACT:**

The present study analyses the oocyte volumetric response to the different stages of development in *Molva macrophthalma*, a cold water species found in the north-western of the Mediterranean Sea.

The same research has also been conducted in a phylogenetically very close species, *Molva dypterygia*, which is distributed in the northeast of the Atlantic Ocean and part of the Arctic Ocean, in order to compare them. The methodology used is based on the analysis of images and, more specifically, on the "Ovarian Packing Density" or OPD. Which, according to the Delesse Principle, that states that the fractional volume of the oocytes is proportional to its fractional cross-sectional area and the calculation of its diameter, allows to determine the number of oocytes per gram of ovary.

The results show that the oocyte volume in both species increases throughout the oocytes development, as it is logical. It has also been observed that *Molva macrophthalma* has chromatin-nucleolar and cortical alveoli oocytes more voluminous than *Molva dypterygia*, considering that it principally inhabits in the Gulf of Lion, an area of high productivity that allows it to have more resources available so as to favour the reproduction. However, it is necessary to indicate that the number of oocytes per gram of ovary is lower in the Mediterranean species. Thus, the favourable conditions in which *Molva macrophthalma* is found allow it to develop eggs of higher quality than the Atlantic species, but this also implies that it can develop less quantity.

Furthermore, it has been detected that the duration of the spawning season of *Molva dypterygia* is shorter than the one of *Molva macrophthalma*, developing the stock of cortical alveoli oocytes synchronously in order to release the eggs in this short period, whereas the Mediterranean species develops its oocytes continuously, releasing the eggs during a long spawning period.

The results agree with the hypothesis that the conditions of the habitat where they live in influence the acquisition of resources that afterwards will be transformed into energy to develop their gonads. In addition to the productivity of the environment, the temperature can also affect the biology of these species, advancing or delaying the spawning period, modifying its duration and altering the reproductive strategy.

## ÍNDEX:

1. INTRODUCCIÓ .....	7
2. AIMS .....	10
3. METODOLOGIA .....	11
ÈTICA I SOSTENIBILITAT .....	16
4. RESULTATS .....	17
5. DISCUSSIÓ .....	24
6. CONCLUSIONS .....	27
7. BIBLIOGRAFIA .....	28

## 1. INTRODUCCIÓ:

Antigament, l'actual espècie *Molva macrophthalma* pescada al Mediterrani es censava com a *Molva dypterygia macrophthalma*, és a dir, es classificava com una subespècie de *Molva dypterygia*, capturada a l'Atlàntic. Estudis relativament recents han demostrat que les seves característiques morfològiques, biològiques i de distribució no coincideixen i, per tant, s'ha acceptat *Molva macrophthalma* com una nova espècie (Cohen, Inada, Iwamoto & Scialabba, 1990).

Ambdues formen part de l'ordre dels Gadiformes o Anacanthini, de la família dels Gadidae (Cohen, 1989) i de la subfamília dels Lotinae (Endo, 2002), i se les coneix popularment com escolà.

Els integrants d'aquestes dues espècies presenten en comú el cos arrodonit i força rígid. Creixen més de llargada que d'amplada, és a dir, mostren una al·lometria positiva. La seva coloració ventral és força clara amb aletes fosques i vores esblanqueïdes. Tenen dues aletes dorsals, la primera és curta, alta i de forma triangular i la segona és baixa i molt llarga, arribant gairebé fins al peduncle caudal. L'aleta anal també és molt llarga i comença a les 2/5 parts de la mida del cos i la caudal és convexa. La mida de les aletes i el nombre de vèrtebres és força similar. La primera aleta dorsal en *Molva macrophthalma* mesura uns 10-12 cm i en *Molva dypterygia* uns 12-14 cm, la segona dorsal uns 76-83 cm i 71-84 cm i l'aleta anal uns 75-78 i 70-75 cm respectivament. El nombre de vèrtebres és de 80-84 en la primera espècie i 76-79 en la segona. Consten d'una mandíbula inferior força prominent, sota la qual presenten un barb fosc d'1 cm de longitud i els seus ulls són relativament grossos, situats a la part alta del cap (Fraser-Brunner & Palmer, 1951).

Tot i això, es poden distingir principalment per la seva longitud màxima i coloració dorsal, les quals són de 108 cm (Froese, Thorson & Reyes, 2013) i gris-rosenc en *Molva macrophthalma* (Figura 1) i 155 cm (Cohen, Inada, Iwamoto & Scialabba, 1990) i gris-marronós en *Molva dypterygia* (Figura 2). També difereixen en la forma de les seves estries, que són radials simples en la primera espècie i radials concèntriques en la segona.

Finalment, si ens fixem en la posició de les aletes pelvianes, trobem que en l'espècie mediterrània estan més avançades que les pectorals, cosa que no succeeix en l'espècie atlàntica, les quals estan en posició vertical, fent que siguin pelvianes jugulars i pelvianes toràciques respectivament.



**Figura 1.** Lamiot, 2008, *Molva macrophthalma* (fotografia).



**Figura 2.** Salesjö, 2006, *Molva dypterygia* (fotografia).

*Molva macrophthalma* forma part de la comunitat demersal del Mediterrani nord-occidental, però també es pot trobar a l'Oceà Atlàntic, concretament des del sud-oest d'Irlanda fins a les costes del Sàhara occidental. Habita en aigües fredes de molta profunditat, entre 30 i 754 m (Mytilineou et al., 2005). És una espècie que viu en fons fangosos i s'alimenta de crustacis i peixos (Macpherson, 1979).

Es reproduïx entre 500 i 600 m, a finals d'hivern i principis de primavera, quan la temperatura de l'aigua és superior als 8°C i es desenvolupa entre 8-13°C. És una estratègia de la K, en altres paraules, té un creixement lent i no assoleix la maduresa sexual fins als 7-11 anys, cosa que comporta una alta vulnerabilitat, de 63 sobre 100 (Cheung, Pitcher & Pauly, 2005). Altrament, la seva resiliència, és a dir, la capacitat que té per absorbir perturbacions sense alterar les seves característiques tornant al punt original, és baixa i el seu temps de duplicació és de 4.5-14 anys (Papasissi, 2008).



**Figura 3.** Nedreaas, 2017, Distribució de *Molva macrophthalma* (imatge)

<http://maps.iucnredlist.org/map.html?id=198592>

Per altra banda, *Molva dypterygia* es distribueix pel nord-est de l'Oceà Atlàntic i part de l'Oceà Àrtic, concretament des del sud-oest del Mar de Barentsz, situat a Noruega, fins al voltant de les Illes Britàniques i viu a fondàries d'entre 150 i 1000 m, tot i que habitualment es localitza entre 350 i 500 m (Svetovidov, 1986). També es troba en fons fangosos i s'alimenta principalment de peixos, tals com la maire (*Micromesistius poutassou*) (Moguedet, 1987) o l'*Argentina silus*, però també de cefalòpodes com el calamar (*Loligo* sp.), crustacis com les gambes (*Pandalus* sp.) i mol·luscs.



**Figura 4.** Fernandes, 2017, Distribució de *Molva dypterygia* (imatge).

L'època de reproducció s'estén des del febrer fins a l'abril, entre 500 i 1000 m de profunditat. No té tendència a realitzar migracions, excepte per passar de la vida pelàgica a la bentònica i durant les concentracions hivernals per reproduir-se (Moguedet, 1987). Aquesta espècie també mostra un creixement lent, on els mascles assoleixen la maduresa sexual al cap de 9 anys, amb una llargada de 75 cm i les femelles al cap d'11 anys amb 88 cm. Els ous de *Molva dypterygia* són pelàgics, amb poc rovell i molt visibles. La fertilitat és alta, de 20 a 60 milions d'ous per femella, cosa que compensa les pèrdues causades pel diàmetre petit dels ous i el poc material de reserva que tenen. Els ous, les larves i els individus immadurs són pelàgics i es desenvolupen en aigües menys profundes, entre 200 i 300 m (Kock & Lambert, 1974). Als 3 anys, assoleixen els 40 cm i a partir d'aquí, creixen uns 5-6 cm/any. Els individus madurs es troben a profunditats majors. S'ha vist que els



mascles aconseguixen la seva llargada màxima als 17 anys i les femelles als 20 (Cohen et al., 1990), amb un pes de 30 kg.

Tant *Molva macrophthalma* com *Molva dypterygia* són iteròpares, o sigui, poden participar en diversos cicles reproductors al llarg de la seva vida. Presenten un cicle reproductor anual, és a dir, totes les femelles madures ponen ous cada any. Desenvolupen i alliberen múltiples lots d'ous durant una mateixa temporada de posta, que pot durar setmanes o mesos, per això se'ls coneix com a espècies de posta múltiple ("batch spawners"). La seva fecunditat és determinada, fet que comporta una bretxa clara en la distribució per mides dels oòcits previtel·logènics i vitel·logènics (Hunter, Macewicz & Kimbrell, 1989). A més a més, també mostren una disminució en el nombre i la mida dels oòcits vitel·logènics tardans a mesura que avança la temporada de posta (Hunter et al., 1992; Greer-Walker et al., 1994; Murua & Saborido-Rey 2003). Tots aquests paràmetres indiquen que les femelles tenen un "stock" fix d'oòcits en estadi d'alvèols corticals i vitel·logènics inicials, i que no van reclutant oòcits en creixement primari al llarg del període de posta, sinó que abans d'iniciar aquest període, han destinat una quantitat d'oòcits que desenvolupen a creixement secundari (Kjesbu, Witthames, Solemdal & Greer-Walker, 1990). L'avantatge metodològic que ofereixen els peixos amb aquest tipus de fecunditat és que la fecunditat total es pot obtenir amb un sol mostreig a l'any realitzat durant l'època adequada i que el potencial de fecunditat és equivalent a la producció d'ous anuals després de comptar les pèrdues per atrèsia (Hunter et al., 1992).

El present treball se centra en (i) l'estudi dels estadis de desenvolupament oocitari de les dues espècies del gènere *Molva*, amb la finalitat d'aportar dades volumètriques imprescindibles per a posteriorment permetre l'aplicació del nou mètode OPD en l'anàlisi de la seva maduració i en l'estimació de la seva fecunditat. L'estudi també té com a objectiu (ii) determinar si les dues espècies presenten diferències en els aspectes reproductius analitzats.

## 2. AIMS:

This research work focuses on two objectives:

- To provide essential volumetric data to allow the application of the new OPD method in the analysis of oocyte maturation of *Molva macrophthalma* and *Molva dypterygia* and in the estimation of their fecundity.
- To determine if *Molva macrophthalma* and *Molva dypterygia* show differences in the analyzed reproductive traits.

To achieve these main goals we must conclude two sub-objectives for each species:

- Differentiation and measurement of every developmental stage of the oocytes.
- Analysis of the diameter frequencies distribution of the oocytes in development.

### 3. METODOLOGIA:

S'analitzen els talls histològics d'ovaris de 13 femelles de *Molva macrophthalma* que procedeixen del Mar Mediterrani, concretament dels ports de Palamós, Roses, Port de la Selva i Llançà; així com les 13 mostres de *Molva dypterygia* que provenen del port de les Illes Vestmannaeyjar, a Islàndia. Les femelles seleccionades es troben en els següents estadis de desenvolupament gonadal, seguint els criteris establerts per Brown-Peterson et al., (2011):

- **Estadi 2 o Desenvolupament:** individus que estan madurant. En desenvolupament primerenc, es veuen oòcits de creixement primari i en estadi d'alvèols corticals; en desenvolupament més tardà es troben oòcits vitel·logènics primaris i secundaris, però no hi ha fol·licles postovulatoris.
- **Estadi 3 o Capaç de reproduir-se:** individus que es reproduiran durant aquella estació reproductiva. Els ovaris contenen oòcits vitel·logènics madurs i amb el nucli en migració. En espècies de posta múltiple es poden detectar fol·licles postovulatoris.
- **Estadi 4 o Fase activa de reproducció:** individus que es troben en plena posta. S'observen oòcits hidratats.

En el present estudi s'utilitza la metodologia basada en l'"Ovarian Packing Density" (OPD) (Kurita & Kjesbu, 2009), el qual és una extensió del mètode autodiamètric que ens ajuda a entendre la dinàmica de reclutament dels oòcits i el potencial reproductiu.

El mètode autodiamètric (Thorsen & Kjesbu, 2001) es basa en el propòsit que existeix una relació entre el diàmetre mitjà dels oòcits vitel·logènics i la densitat oocitària (nº oòcits/g ovari) utilitzant una corba de calibratge. Concretament, en reproductors determinats aquesta relació és molt estreta, és a dir, un cop aquesta s'ha establert, la densitat oocitària pot ser estimada mesurant el diàmetre mitjà dels oòcits vitel·logènics, i a partir d'aquesta dada i el pes de l'ovari es coneix el nombre d'oòcits en desenvolupament.

L'OPD implica més simplicitat de mostreig i una mesura molt més ràpida del diàmetre mitjà dels oòcits utilitzant l'anàlisi de partícules en les imatges. Proporciona una estimació fiable de la fecunditat i de la distribució de la mida dels oòcits segons l'estadi de desenvolupament (Thorsen & Kjesbu, 2001; Klibansky & Juanes 2008; Witthames et al., en premsa). Ara bé, per a poder-se aplicar cal realitzar abans un estudi detallat de la volumetria dels diferents estadis de desenvolupament oocitari, aspecte que es treballa en aquest Treball Final de Grau.

Teòricament, l'OPD pot ser calculat mitjançant quatre variables (fórmula 1): cODvi (diàmetre mitjà de l'estadi de desenvolupament de l'oòcit basat en el seu volum i corregit pel factor d'encongiment, extret de l'article desenvolupat per Saber, Macías, Urbina & Kjesbu (2016) sobre *Thunnus alalunga*), Vvi (fracció de volum), po (densitat de l'ovari) i Ki (factor de la forma mitjana de cada estadi de desenvolupament oocitari; estimat a partir de la relació entre els eixos curts (S) i llargs (L)).

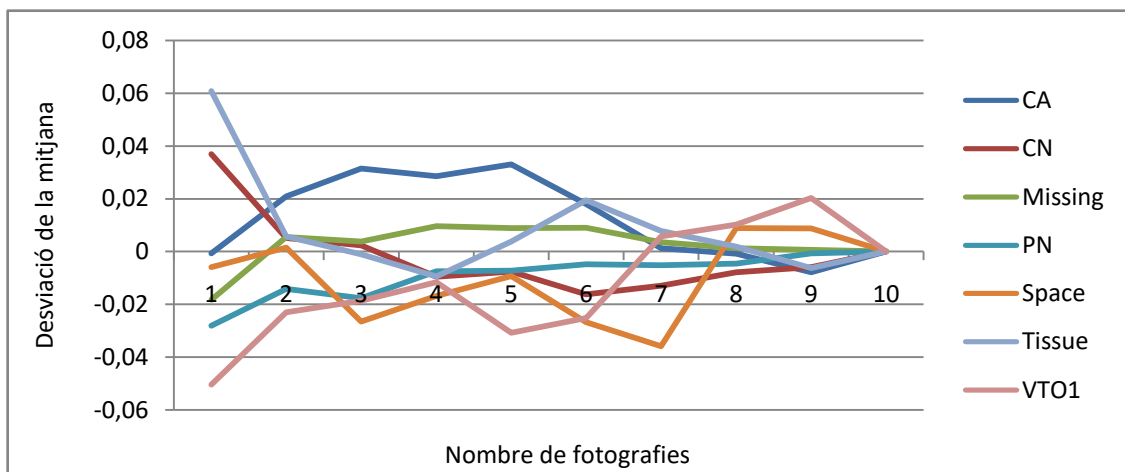
$$OPDi = \log \left[ Vvi \times \left( \frac{1}{\rho_0} \right) \times \{ (1 + ki)^3 / 8 \times ki \} + 12.28 - \log(cODvi) \right]$$

**Fórmula 1.** OPD (Kurita and Kjesbu, 2009; Korta et al 2010b).

El valor de  $Vvi$  fa referència a la fracció de volum que ocupen els diferents estadis de desenvolupament dels d'òcits, els atrèsics, els fol·licles postovulatoris i els vasos sanguinis; i és proporcional a l'àrea de secció transversal que ocupen cadascun d'ells, segons el Principi de Delesse (Emerson, Greer-Walker & Witthames, 1990). Per estimar-lo, es duu a terme la tècnica estereològica (Weibel & Gomez, 1962), la qual es basa en la interpretació tridimensional d'imatges bidimensionals.

Concretament, els talls histològics s'examinen a través de l'augment 4x d'un microscopi òptic Olympus BX40 amb una càmera digital Zeiss AxioCam ICc 1, els quals estan connectats a un ordinador. S'utilitza el programa d'anàlisi d'imatges ZEN per tal de facilitar la feina, ja que ofereix una millor visualització de les mostres a través de la pantalla i una fàcil captura d'imatges.

Es realitzen 6 fotografies de 0.855px/um per mostra de manera alternada per garantir un error < 0.05 i així, evitar dobles comptatges dels oòcits i, per tant, una sobreestimació. Aquest nombre de fotografies s'ha establert mitjançant un gràfic en l'Excel (Figura 5) que permet calcular la desviació de la mitjana, és a dir, el mínim nombre de fotografies necessàries per a obtenir el mateix error que si se'n realitzen 10, a fi de donar-li lleugeresa i agilitat a l'estudi.



**Figura 5.** Gràfic de la desviació de la mitjana dels diferents estadis de desenvolupament oocitari, representats en línies de diversos colors, segons el nombre de fotografies. Estadis: CN (cromatina-nucleolar), PN (perinucleolar), CA (alvèols corticals), VTO1 (vitel·logènica I), Tissue (teixit), Space (espai) i Missing (absència a causa del procediment histològic).

En primer lloc, cal identificar i classificar els oòcits en les seves diferents fases de desenvolupament:

La fase de creixement primari conté les **oogònia** i els estadis de **cromatina-nucleolar (CN)** i **perinucleolar (PN)**. Les oogònia es distingeixen com petites cèl·lules arrodonides, de nucli esfèric, pàl·lid i molt voluminos. L'estadi de cromatina-nucleolar es caracteritza per presentar

oòcits amb un nucli que ocupa bona part de la cèl·lula i conté un o pocs nuclèols grossos i una capa de citoplasma, prima, basòfila i força homogènia. L'estadi perinucleolar consisteix en oòcits amb nombrosos nuclèols que comencen a migrar cap a la perifèria del nucli, al voltant de la membrana nuclear. El nombre de nuclèols s'estabilitza i el citoplasma esdevé granular. També es veu una capa senzilla de cèl·lules fol·liculars que embolcallen l'oòcit i damunt es troba la làmina basal, les cèl·lules de la teca i l'epiteli (Muñoz, 2000).

La fase de creixement secundari presenta l'estadi d'**alvèols corticals** (CA) i els estadis **vitel·logènics I, II i III**. En l'estadi d'alvèols corticals apareixen aquests orgànuls a la perifèria del citoplasma. Els nuclèols segueixen a la perifèria del nucli i el citoplasma es torna acidòfil. Aquest estadi és molt curt perquè ràpidament es detecten grànuls de vitel, els quals proporcionaran aliment al futur embrió, fet que fa que ja es consideri estadi vitel·logènic. En l'estadi d'alvèols corticals també s'observa la zona radiata, molt acidòfila. L'estadi vitel·logènic rep aquest nom per la presència de grànuls de vitel a la perifèria del citoplasma i té la membrana nuclear ondulada amb els nuclèols situats perifèricament. En l'estadi vitel·logènic I (VTO I), els grànuls encara són molt petits. L'estadi vitel·logènic II (VTO II) es diferencia de l'anterior perquè els grànuls de vitel augmenten en nombre, mida i distribució, ocupant gairebé tot el citoplasma. El gruix mitjà de la zona radiata augmenta. En l'estadi vitel·logènic III (VTO III), els grànuls de vitel són molt més voluminosos i a la zona radiata es diferencien tres capes: la capa Z1 més externa i homogèniament electrodensa, la Z2 mitjana granular i menys electrodensa i la zona radiata interna o Z3 que presenta una estructura multilamel·lar (Muñoz, 2000).

Finalment, en la fase de maduració el **nucli migra** (MN) cap a la perifèria del citoplasma i els nuclèols cap al seu centre. El citoplasma està ocupat per grànuls de vitel acidòfils i molt voluminosos que es fusionen entre si. Els grànuls de vitel acaben formant una massa homogènia i el nucli no és visible perquè la seva membrana s'ha desintegrat i el seu contingut s'ha dispersat pel citoplasma. A causa de l'augment de volum de l'oòcit provocat per la incorporació d'aigua o **hidratació** (HY), el fol·licle es fa més prim (Muñoz, 2000). El procés d'hidratació serveix per facilitar l'expulsió dels oòcits gràcies a l'increment de pressió interna i per afavorir la flotabilitat dels ous en el medi marí. L'inici d'aquest procés indica que la posta és imminent (Fulton, 1898).

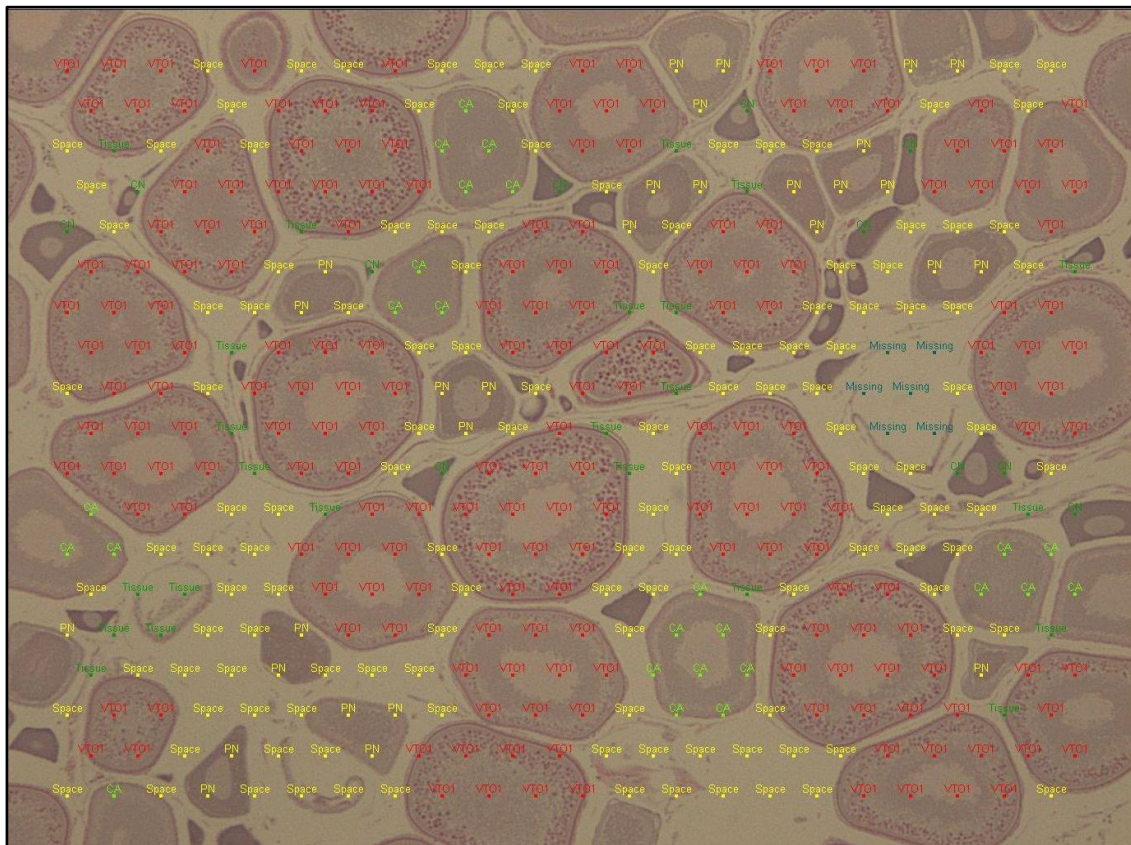
Després de l'ovulació, s'observen els **fol·licles postovulatoris**, els quals es mostren com embolcalls fol·liculars buits que degeneren molt ràpidament. Són estructures que es repleguen sobre si mateixes, amb vacúols i grànuls eosinòfils al lumen. Les parets de les cèl·lules fol·liculars costen molt de distingir i els fol·licles esdevenen cada vegada més replegats i petits fins que desapareixen (Muñoz, 2000).

Alguns oòcits poden ser degenerats i absorbits per l'ovari, aquests reben el nom d'**oòcits atrèsics** (Guraya, 1986). Aquest fenomen és molt important per regular el nombre d'ous que seran alliberats i recuperar energia. Es pot distingir entre atrèsia alfa, la més inicial i beta, la més tardana. El seu nucli es torna granular i irregular fins a desintegrar-se, els grànuls de vitel del citoplasma tenen mides molt diverses i formes poc regulars i la zona radiata també pren

una forma irregular fins a fragmentar-se. Les cèl·lules de la granulosa hipertrofiades envaeixen el citoplasma de l'òocit per reabsorbir el seu vitel (Muñoz, 2000).

Una vegada diferenciats els diferents estadis de desenvolupament oocitari, es procedeix a determinar el volum relatiu que ocupa cada tipus d'òocit mitjançant unes quadrícules Weibel (1979) superposades i un sistema de punts sobre cada imatge utilitzant el programa d'anàlisi d'imatges assistides per ordinador Image J (Schneider et al., 2012).

Damunt de cada punt, el número dels quals s'ha modificat per analitzar-ne un total de 418 per fotografia, s'assigna la categoria que li correspon, les quals també han estat adaptades pel nostre estudi i es poden observar en la Figura 6.

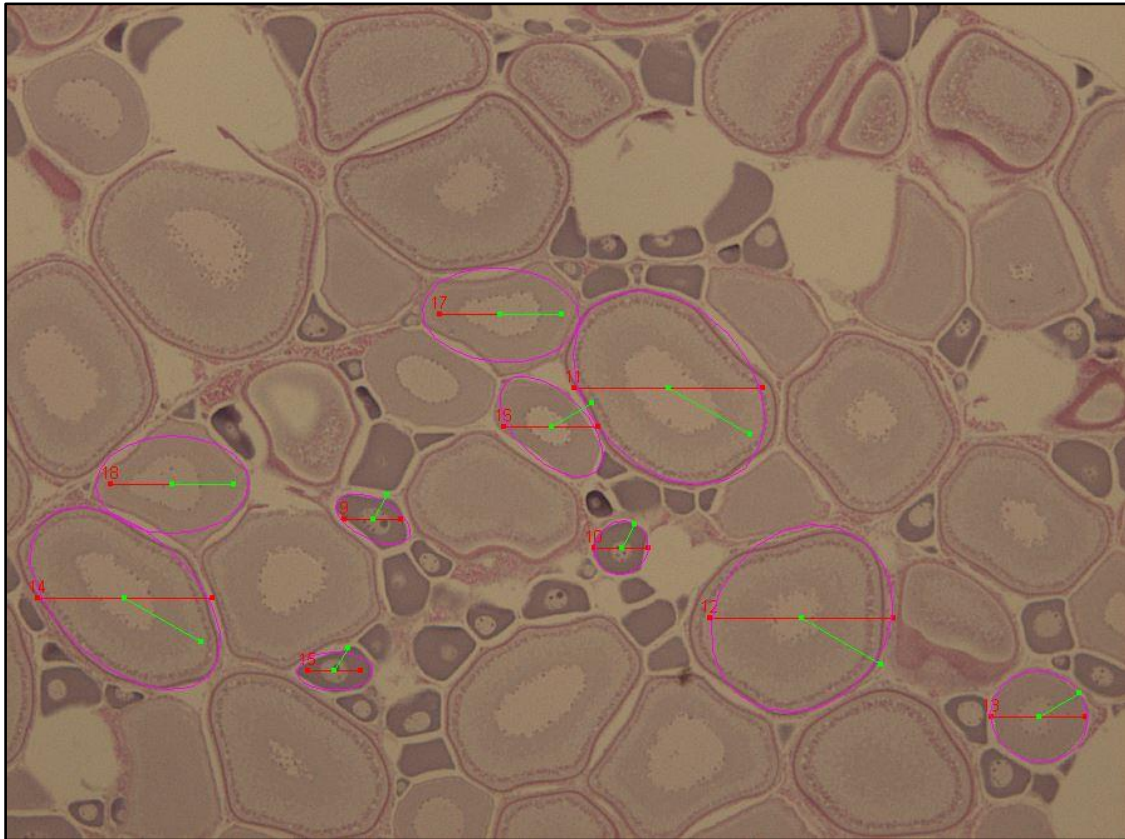


**Figura 6.** Exemple de mesura del volum que ocupa cada tipus d'òocit d'una mostra de *Molva macrophthalmal* analitzada mitjançant la quadrícula Weibel i el sistema de punts de l'Image J.

Dividint el nombre de punts que correspon a un cert tipus d'òocit pel nombre total de punts, es pot saber el volum que ocupa cada categoria. Això permet obtenir unes anàlisis completos que inclouen el nombre d'òocits dels diversos estadis, atrèsia, mida d'ous, fol·licles postovulatoris, entre d'altres i, per tant, resultats més precisos i fiables, tot i que es requereixen instruments tecnològics més costosos com microscopis i equipaments informàtics i de vídeo. Les dades obtingudes proporcionen el percentatge dels diferents estadis en què es troben els òocits de les mostres.



A més a més, amb aquest programa també es pot conèixer el diàmetre, ja que s'utilitza un mètode autodiamètric, mesurant la relació entre la longitud dels eixos curts i llargs de 10 oòcits de cada estadi tallats per la meitat del nucli (Figura 7).



**Figura 7.** Exemple de mesura del diàmetre d'una mostra de *Molva macrophthalmalme* analitzada mitjançant el programa informàtic ImageJ.

Un cop es disposa d'aquests resultats, si s'aplica la Fórmula 1 i es multiplica pel pes total de l'ovari amb l'Excel, es pot saber el nombre d'oòcits/ovari  $i$ , per tant, deduir el nombre d'ous que pondrà la femella durant la temporada de posta. Tanmateix, amb els valors del nombre d'oòcits mitjà per gram d'ovari en les diferents fases de creixement secundari, es podrà determinar quin percentatge mitjà representen cadascuna d'elles  $i$ , d'aquesta manera, analitzar el patró de desenvolupament de cada espècie.

Per tal de poder analitzar els resultats amb certesa i acceptar o rebutjar la presència de diferències significatives s'ha utilitzat el software R amb el paquet Rcmdr i el plugin FactoMineR. S'han cercat d'entre totes les dades mitjanes de volum, diàmetre i nombre d'oòcits per gram d'ovari, les categories amb una  $n > 7$ , és a dir, els estadis oocitaris que estiguessin representats en més de 7 femelles per espècie, ja que alguns estadis només s'han trobat en un nombre reduït de mostres  $i$ , per tant, les anàlisis estadístics posteriors no són prou fiables.

Seguint aquest criteri s'ha realitzat una anàlisi exploratòria, concretament, una anàlisi de components principals (PCA) només amb les mostres de CNVvi, PNVvi, CAVvi, TissueVvi, CNODvi, PNOdvi, CAODvi, CNOPD, PNOPD i CAOPD per tal de tenir una primera idea de com es comporten aquestes variables i després s'han creat models Generalized Linear Model (GLM)

amb família binomial i funció d'enllaç Logit per determinar quines d'aquestes expliquen diferències significatives entre les dues espècies. La bondat d'ajust dels models s'ha calculat a partir de l'Akaike information criterion (AIC).

S'ha escollit aquesta anàlisi, ja que és preferible treballar amb una anàlisi multivariant quan es disposa de força variables, ja que permet detectar diferències que amb una anàlisi univariant no es veurien. Així doncs, compara diferents variables entre elles, de manera individual i en conjunt, cosa que permet observar més diferències.

### **ÈTICA I SOSTENIBILITAT:**

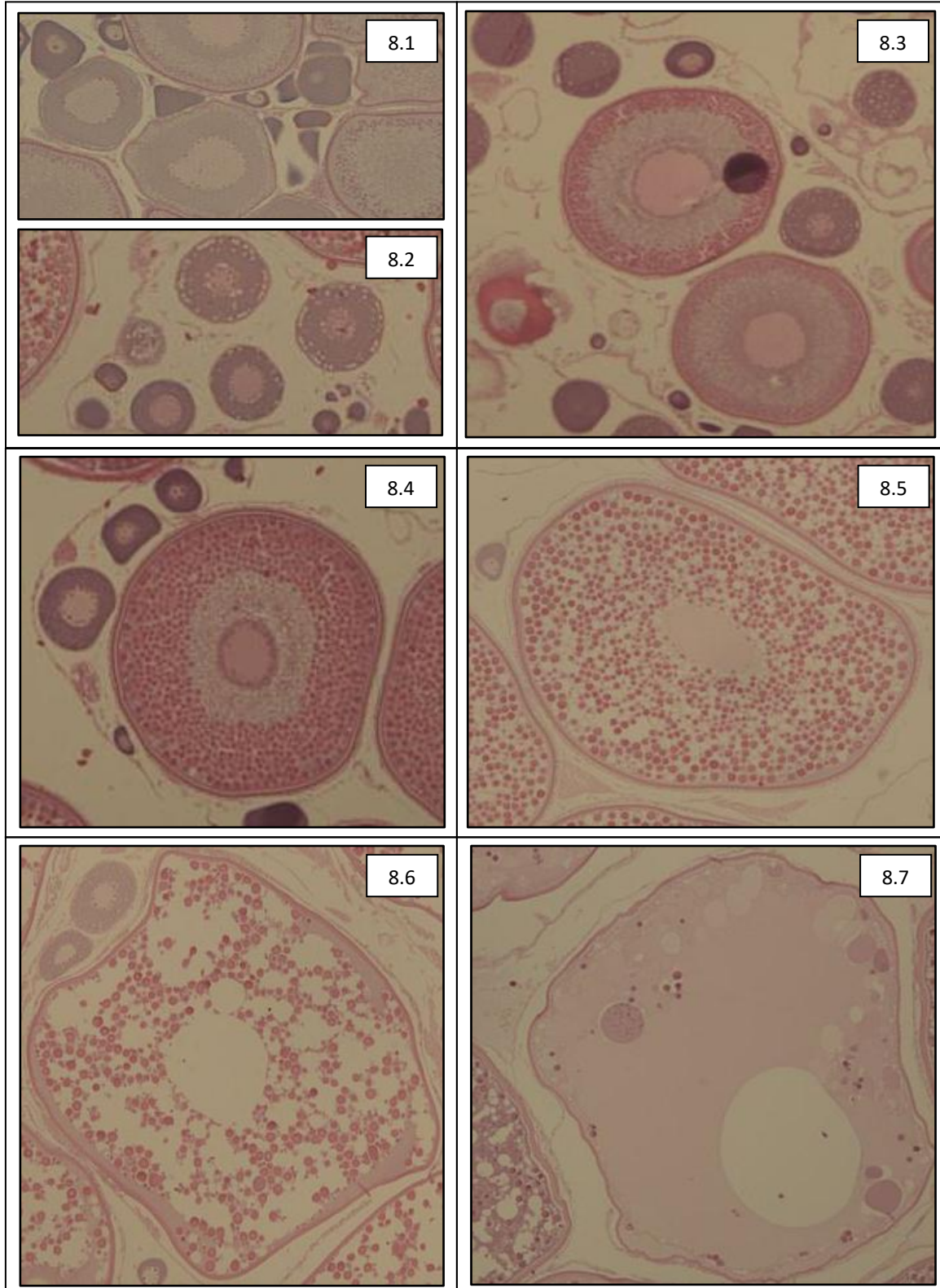
Les mostres s'obtenen dels ports, és a dir, les femelles han estat capturades seguint la normativa vigent i s'han portat a un laboratori professional on s'han manipulat correctament, amb el material esterilitzat i els residus s'han tractat de forma correcta, llençant les substàncies tòxiques o els tints al contenidor adient.

Al ser espècies que es troben en regressió, és de major importància dur a terme estudis per tal de determinar els factors que provoquen la seva disminució i així poder establir les posteriors mesures de conservació necessàries per a cada espècie.



#### 4. RESULTATS:

S'han fet fotografies (Figura 8) dels diferents estadis de desenvolupament oocitari per facilitar la seva identificació i posterior comparació. D'aquesta manera, s'ha vist que tots els estadis són força semblants en ambdues espècies, excepte el perinucleolar i el d'alvèols corticals.



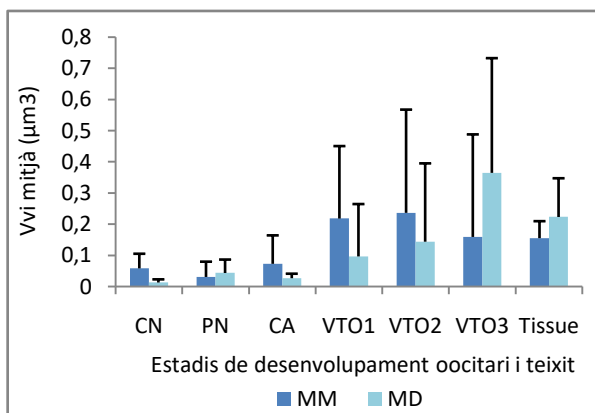
**Figura 8.** Oòcits en diversos estadis de desenvolupament. La imatge 8.1 mostra CN, PN i CA, sense tenir en compte les oogònia, en *Molva macrophthalmal* i la 8.2 en *Molva dypterygia*. La imatge 8.3 fa referència a VTO I, 8.4 a VTO II, 8.5 a VTO III, 8.6 a MN i 8.7 a HY.

S'han hagut d'establir uns criteris per tal de poder assignar les categories perinucleolar i alvèols corticals en les dues espècies, ja que com s'ha dit anteriorment, mostren algunes diferències morfològiques i, per tant, és costós distingir-les.

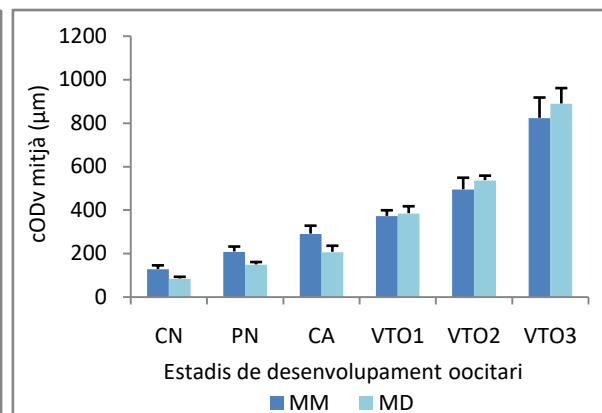
Per una banda, *Molva macrophthalma* disposa d'uns oòcits perinucleolars (Figura 8.1) més grossos i clars, amb una capa de cèl·lules fol·liculars més aparents i un citoplasma més homogeni que *Molva dypterygia* (Figura 8.2). D'altra banda, els oòcits en estadi d'alvèols corticals de l'espècie mediterrània tenen un còrion que queda tenyit de color "fúcia" força subtil, una capa de cèl·lules fol·liculars més ampla i el citoplasma està dividit en dues regions, una de perifèrica clara on hi ha alvèols molt petits i una d'interna més fosca (Figura 8.1), per contra els de l'espècie atlàntica són més petits, presenten un citoplasma menys tenyit on es veuen els alvèols més estesos i una capa fina de cèl·lules fol·liculars (Figura 8.2).

Per tal de valorar més detalladament l'existència de diferències entre *Molva macrophthalma* i *Molva dypterygia* s'han perseguit una sèrie de subobjectius, els quals també han permès obtenir les dades volumètriques que s'utilitzaran pel posterior anàlisi amb el mètode ODP.

La Figura 9 mostra la Vvi o fracció de volum mitjà que ocupen el teixit i cadascun dels estadis de desenvolupament oocitari de *Molva macrophthalma* (en blau fosc) i *Molva dypterygia* (en blau cel) i la seva desviació estàndard. A la Figura 10 es pot veure el cODv o diàmetre mitjà corregit pel factor d'encongiment causat per la preservació i la deshidratació en etanol dels oòcits d'ambdues espècies i la seva desviació estàndard.



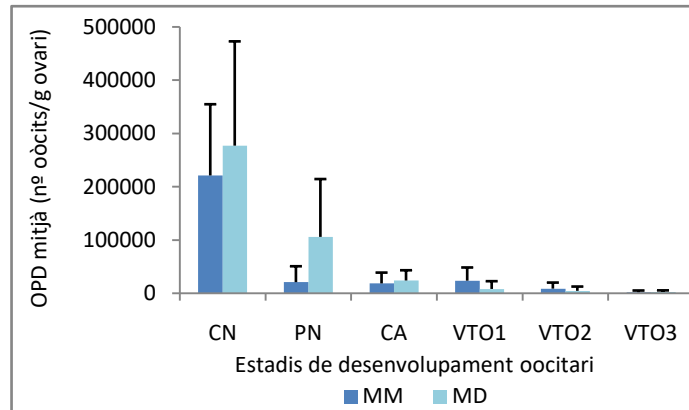
**Fig 9.** Fracció de volum mitjà del teixit i els oòcits de *Molva macrophthalma* (MM) i *Molva dypterygia* (MD) i la seva desviació estàndard.



**Fig 10.** Diàmetre mitjà corregit per encongiment dels oòcits de *Molva macrophthalma* (MM) i *Molva dypterygia* (MD) i la seva desviació estàndard.

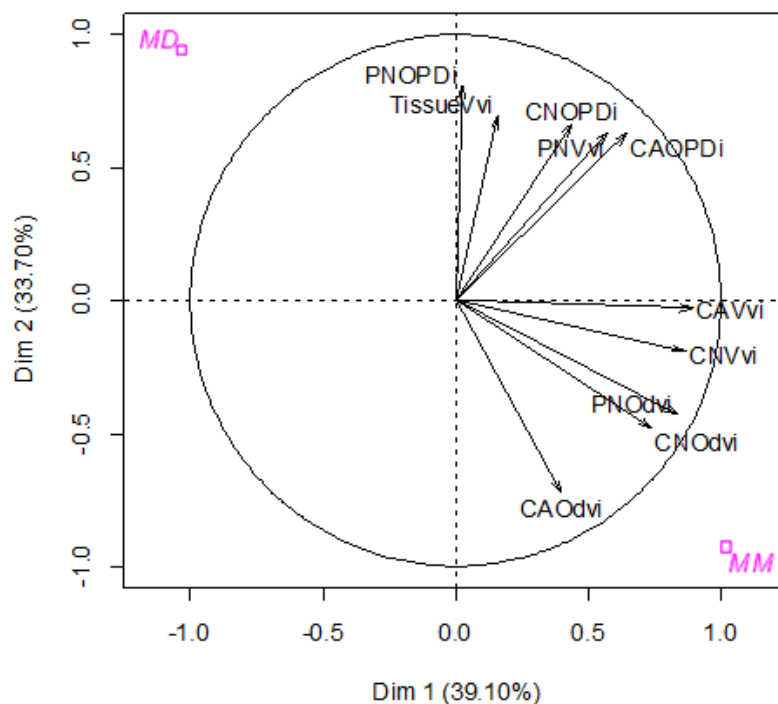
Cal destacar que en els dos gràfics anteriors i el següent, només s'analitzen els oòcits fins a l'estadi de desenvolupament vitel·logènic III. Així doncs, més endavant ja es parlarà dels estadis més madurs, tals com nucli en migració i hidratació.

Gràcies als resultats obtinguts en els dos gràfics anteriors, s'ha pogut realitzar el gràfic de la Figura 11, el qual fa referència a l'OPD o nombre d'òcits mitjà per gram d'ovari de l'espècie mediterrània i l'espècie atlàntica, amb la respectiva desviació estàndard.



**Fig 11.** Nombre d'òcits mitjà per gram d'ovari de *Molva macrophthalma* (MM) i *Molva dypterygia* (MD) i la seva desviació estàndard.

En la Figura 12 es presenta l'anàlisi exploratòria PCA, on, a partir dels vectors, es pot veure el comportament que segueixen les diferents variables. D'aquesta manera, els que es dirigeixen cap a *Molva macrophthalma* seran majors o descriuran aquesta variable en els valors més elevats per aquesta espècie, i per tant, presentaran diferències i els vectors que quedin entremig seran iguals per ambdues espècies.



**Fig 12.** PCA de les mitjanes de volum, diàmetre i OPD dels estadis cromatina-nucleolar (CNVvi, CNOdvi, CNOPDi), perinucleolar (PNVvi, PNOdvi, PNODPi) i alvèols corticals (CAVvi, CAOdvi, CAOPDi) i teixit (TissueVvi) respectivament. MM: *Molva macrophthalma* i MD: *Molva dypterygia*.

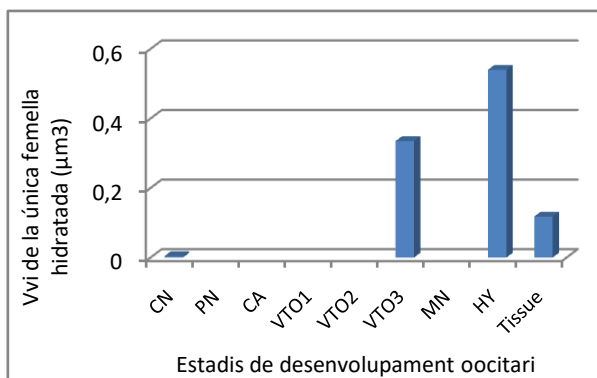
La variància explicada per aquesta PCA és de 72.8%, cosa que permet considerar-la força fiable a l'hora d'interpretar els resultats.

En la taula 1 es comparen els set millors models obtinguts a partir del GLM, els quals poden determinar les diferències entre les dues espècies, sempre que el p-valor sigui inferior a 0.05, fet que indicarà que les diferències són estadísticament significatives. A més a més, per considerar-lo un bon model, el criteri de selecció del model o AIC ha de ser baix.

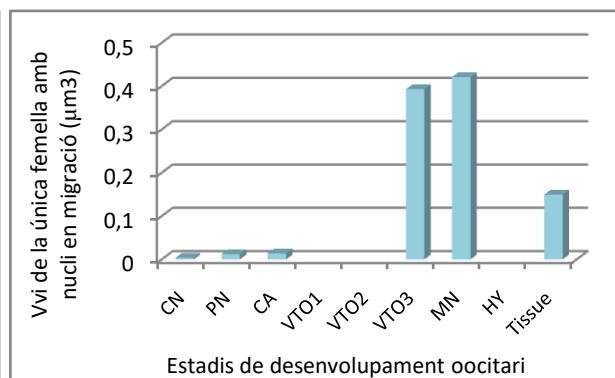
**Taula 1.** Comparació dels set millors models del GLM per determinar diferències entre espècies. Codis de significació del p-valor: 0 '\*\*\*\*' 0.001 '\*\*' 0.01 '\*' 0.05 '.' 0.1 '.' 1

		Coefficient	P value	AIC
<b>Model 1</b>	<b>Sp ~ CNVvi</b>			27.74
	Intercept	-1.8458	0.0262*	
	CNVvi	70.6834	0.0321*	
<b>Model 2</b>	<b>Sp ~ CAVvi</b>			25.297
	Intercept	-2.812	0.0295*	
	CAVvi	62.434	0.0586 .	
<b>Model 3</b>	<b>Sp ~ CNVvi + CAVvi</b>			16.998
	Intercept	-4.227	0.0182*	
	CNVvi	179.648	0.0462*	
	CAVvi	-31.216	0.2502	
<b>Model 4</b>	<b>Sp ~ CNODvi</b>			9.4459
	Intercept	-39.9962	0.177	
	CNODvi	0.4145	0.190	
<b>Model 5</b>	<b>Sp ~ CAODvi</b>			9.5896
	Intercept	-44.0370	0.109	
	CNODvi	0.1736	0.107	
<b>Model 6</b>	<b>Sp ~ CNOPDi</b>			39.267
	Intercept	5.377e-01	0.465	
	CNOPDi	-2.171e-06	0.391	
<b>Model 7</b>	<b>Sp ~ CNOPDi + CAVvi</b>			24.422
	Intercept	-2.651e+00	0.1320	
	CNOPDi	-6.173e-06	0.1378	
	CAVvi	1.046e+02	0.0858	

A continuació, per separat, es mostra la fracció de volum que ocupen el teixit i els estadis oocitaris de les dues úniques mostres, una de *Molva macrophthalma* (Figura 13) i una de *Molva dypterygia* (Figura 14) de les quals es disposa de dades per la fase de maduració. Es tracta d'una femella de l'espècie mediterrània amb oòcits en hidratació, al gràfic de l'esquerra i una femella de l'espècie atlàntica amb oòcits en nucli en migració, al gràfic de la dreta. D'aquesta manera, s'ha volgut representar com seria el seu cicle de desenvolupament oocitari sencer.

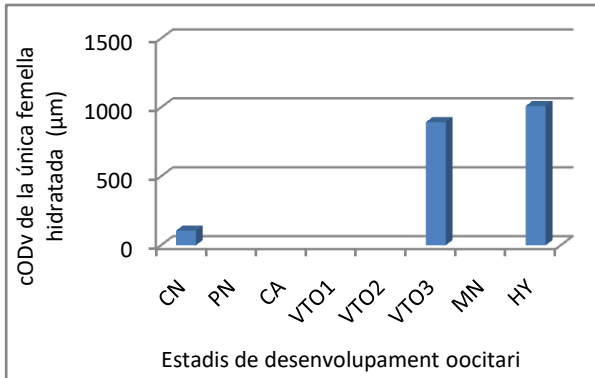


**Fig 13.** Fracció de volum de la única femella de *Molva macrophthalma* en fase de maduració.

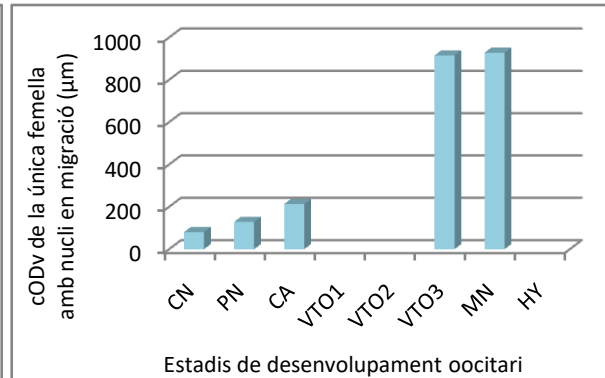


**Fig 14.** Fracció de volum de la única femella de *Molva dypterygia* en fase de maduració.

També es presenta els gràfics del diàmetre corregit pel factor d'engorgiment dels oòcits d'aquestes dues femelles que estan en fase de maduració. El gràfic de l'esquerra (Figura 15) fa referència a *Molva macrophthalma* i el de la dreta (Figura 16), a *Molva dypterygia*. Així, també es pot demostrar com seria el cicle de desenvolupament oocitari complet.

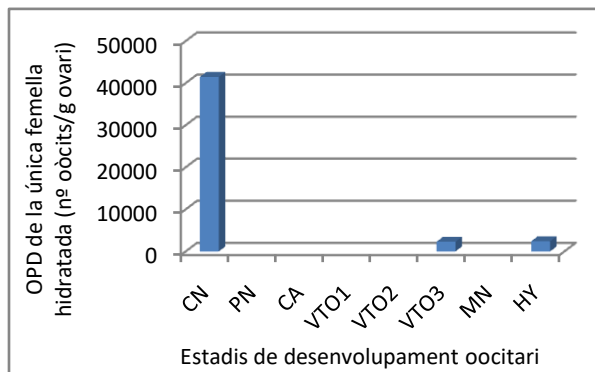


**Fig 15.** Diàmetre corregit per engorgiment de la única femella de *Molva macrophthalma* en fase de maduració.

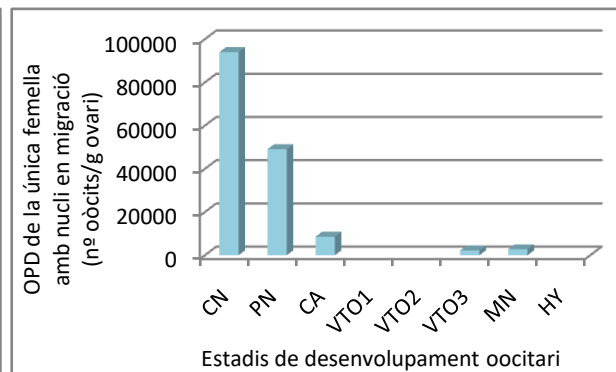


**Fig 16.** Diàmetre corregit per engorgiment de la única femella de *Molva dypterygia* en fase de maduració.

A més a més, les figures 17 i 18 recullen informació sobre el nombre d'oòcits per gram d'ovari d'aquestes dues femelles madures. Com ja s'ha dit, el gràfic de l'esquerra correspon a la femella mediterrània (Figura 17) i el gràfic de la dreta (Figura 18), a l'atlàntica.

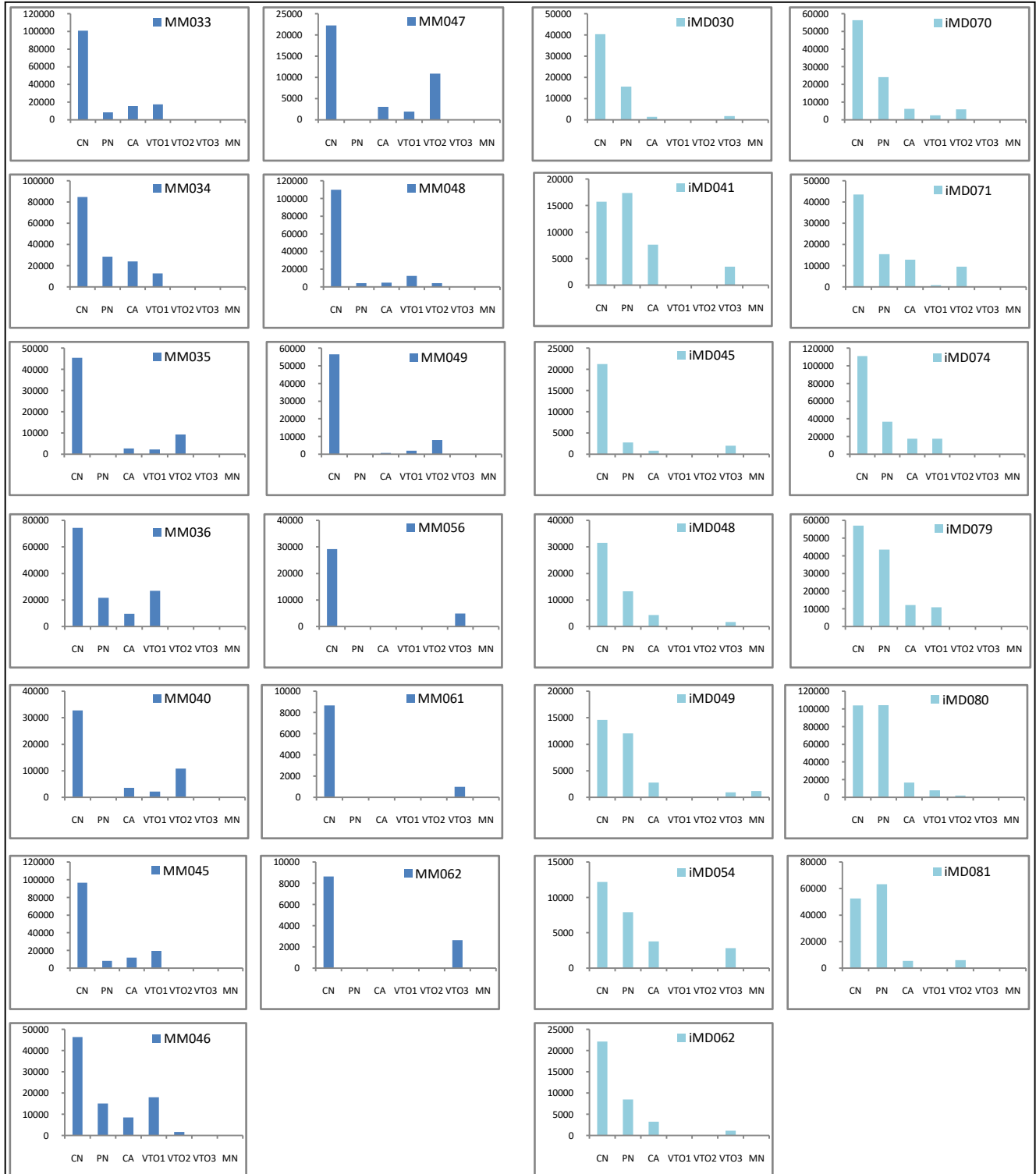


**Fig 17.** Nombre d'oòcits per gram d'ovari de la única femella de *Molva macrophthalma* en fase de maduració.



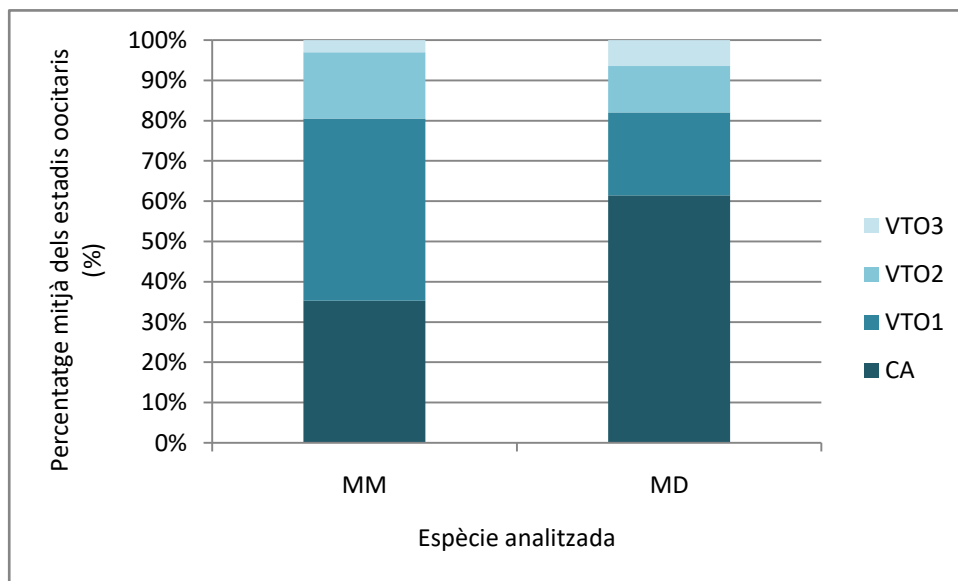
**Fig 18.** Nombre d'oòcits per gram d'ovari de la única femella de *Molva dypterygia* en fase de maduració.

Tot seguit, s'exposen un conjunt de gràfics de l'OPD o nombre d'òcits en cadascun dels estadis de desenvolupament per gram d'ovari per cada una de les mostres per ambdues espècies (Figura 19), per tal de facilitar la comparació en la seva distribució entre les dues espècies. A l'esquerra i en color blau fosc, es troben les dades de *Molva macrophthalma* i a la dreta i en blau cel, les de *Molva dypterygia*.



**Fig 19.** Nombre d'òcits en cada estadi de desenvolupament per gram d'ovari de cadascuna de les mostres de *Molva macrophthalma* (a l'esquerra, en blau fosc) i *Molva dypterygia* (a la dreta, en blau cel).

Finalment, s'ha representat el percentatge mitjà que correspon a cadascun dels estadis de desenvolupament oocitari en creixement secundari per ambdues espècies (Figura 20) per tal d'analitzar el seu patró de desenvolupament oocitari.



**Fig 20.** Percentatge en els estadis de desenvolupament dels oòcits en creixement secundari de *Molva macrophthalma* i *Molva dypterygia* obtingut a partir de les dades de nombre d'oòcits mitjà per gram d'ovari. Estadis: CA (alvèols corticals), VTO I (vitel·logènic I), VTO II (vitel·logènic II) i VTO III (vitel·logènic III). Espècies estudiades: MM (*Molva macrophthalma*) i MD (*Molva dypterygia*).



## 5. DISCUSSIÓ:

En el primer gràfic (Figura 9) s'observa que a mesura que s'avança en els estadis oocitaris, el volum augmenta, en ambdues espècies, ja que els oòcits van experimentant un increment en la seva mida i, per tant, en l'espai que ocupen, al llarg del seu cicle de desenvolupament. Encara que en *Molva macrophthalma* es veu com el volum que ocupa l'estadi vitel·logènic III, tot i ser més gran de mida que el vitel·logènic II, és inferior perquè només s'ha trobat en tres femelles de les tretze analitzades, ja que depèn molt del moment en què s'ha agafat la mostra. En canvi, en *Molva dypterygia*, que apareix en set de les tretze femelles, la fracció de volum mitjà segueix la tendència esperada. També es veu que hi ha molta variabilitat entre les mostres dins d'una mateixa espècie, probablement perquè són els resultats del volum que ocupen tots els oòcits en un estadi de desenvolupament concret dins de l'ovari, cosa que va canviant a cada femella perquè el desenvolupament és individual i, encara que dues femelles estiguin en la mateixa fase de reproducció, segur que una estarà més avançada en la maduració que l'altra. A més a més, sembla que el volum que ocupen els diferents estadis de desenvolupament oocitari de *Molva macrophthalma* tendeixen a ser més grans que en *Molva dypterygia*, però s'intueix que aquesta última espècie consta d'un volum major de teixit.

Per tal de poder calcular l'OPD també es necessiten els resultats del diàmetre mitjà corregit dels estadis oocitaris, els quals es mostren en la Figura 10, on s'observa clarament que el diàmetre va augmentant a mesura que es desenvolupen els oòcits, tot i que no es veuen gaires diferències entre ambdues espècies. En aquest cas, el diàmetre de les diferents femelles no és tan variable dins de la mateixa espècie perquè s'han mesurat oòcits en el mateix estadi de desenvolupament i encara que siguin de diferents femelles, cada estadi té un diàmetre poc variable, ja que quan creixen de mida i volum és quan canvien d'estadi de desenvolupament.

Com a conseqüència dels resultats obtinguts en els dos gràfics anteriors, s'ha pogut crear el gràfic de la Figura 11, el qual mostra que el nombre d'oòcits mitjà per gram d'ovari disminueix sobtadament després del primer estadi en *Molva macrophthalma* i a partir d'aquí es manté força constant i que en *Molva dypterygia* descendeix progressivament al llarg de tot el desenvolupament. La desviació estàndard en aquest cas és bastant elevada, cosa que indica una alta variabilitat entre les mostres dins de cada espècie. També sembla que l'OPD és molt més petit per l'espècie mediterrània que per l'atlàntica en l'estadi perinucleolar, però que en la resta d'estadis és força similar. El fet que la primera espècie mostri aquest estadi menor pot ser causat, igual que passa amb el volum, per la seva presència en sis femelles de les tretze mediterrànies, en comparació amb l'atlàntica que hi és a totes.

Per tal de poder detectar de manera fiable si existeixen diferències significatives en ambdues espècies, s'han realitzat dues anàlisis estadístiques, una PCA (Figura 12) i un GLM (Taula 1) per les variables mencionades en l'apartat de materials de mètodes. D'aquesta manera s'ha pogut observar, mitjançant els diferents models acceptats pel GLM, que hi ha diferències significatives entre ambdues espècies pel que fa al volum mitjà dels oòcits en estadi de cromatina-nucleolar (CNVvi) i d'alvèols corticals (CAVvi), ja sigui, per ells mateixos o analitzats en conjunt, essent més gran en *Molva macrophthalma*. També s'ha detectat que el conjunt d'OPD de l'estadi de cromatina-nucleolar (CNOVD) i el volum d'alvèols corticals (CAVvi) presenten diferències, tendint a tenir més oòcits per gram d'ovari en *Molva dypterygia*, encara



que aquestes no acaben de ser estadísticament significatives. Els diàmetres dels estadis de cromatina-nucleolar (CNOdvi) i d'alvèols corticals (CAOdvi) per separat tampoc mostren diferències significatives, tot i que hi ha tendència a haver-hi diferències.

Els resultats d'aquest estudi poden ser causats pel factor espècie en general, tot i que l'existència de diferències en el diàmetre o volum dels estadis oocitaris també poden reflectir diferències en l'estat de condició en què es troben els individus de les dues espècies analitzades segons l'hàbitat en el qual viuen, fet que s'ha vist en l'estudi sobre *Argentina sphyraena* de Serrat et al., (in press). S'ha observat clarament que alguns estadis oocitaris de *Molva macrophthalma* presenten un volum major que en *Molva dypterygia*, però que el seu OPD és inferior, tot i que faltaria disposar de més dades per a poder confirmar aquesta dada, ja que com ja s'ha dit, les diferències no han estat estadísticament significatives, possiblement per una n baixa.

Això s'explica pel fet que la primera espècie habita en la zona del Golf de Lleó, una de les zones més productives del Mar Mediterrani, ja que la circulació ciclònica permanent de les aigües superficials i les conveccions verticals intenses promouen una gran floració algal i, per tant, una producció primària elevada (Bosc, et al., 2004). S'estima que la producció primària neta total en aquesta zona és de 1042,4 t km<sup>-2</sup> any<sup>-1</sup> (Bănaru et al., 2013). D'aquesta manera, com en més bones condicions es trobin, més recursos podran adquirir i més reserves energètiques tindran, les quals, aniran destinades a desenvolupar les gònades i posteriorment, a generar ous, en menor quantitat per lot (tal com suggereix la menor OPD), però de més qualitat (major volum oocitari). En el cas de *Molva dypterygia*, la disponibilitat d'aliment en el seu hàbitat és menor i, per tant, els seus oòcits tindran un volum més petit, mancança que podrà compensar amb una posta més nombrosa.

Per altra banda, també és important considerar l'efecte temperatura, ja que hi ha estudis que han demostrat que aquesta també pot influir en la quantitat i qualitat dels ous (Conover, 1985; Tanasichuk & Ware, 1987; Heins et al., 2004; Murua et al., 2006; Castro et al., 2009; Leal et al., 2009). És a dir, es podria suposar que *Molva macrophthalma* viu en millors condicions que *Molva dypterygia* perquè aprofita l'alta productivitat d'aquesta zona i de moment la temperatura li és favorable. Ara bé, cal tenir en compte que si el canvi de volum i OPD dels oòcits d'aquesta espècie depengués només de les condicions ambientals de l'hàbitat on viu, a la llarga potser el rol s'invertiria perquè l'increment de temperatura del Mar Mediterrani associat al canvi climàtic no li serà favorable, ja que es tracta d'espècies que necessiten aigües fredes per a reproduir-se.

En les figures 13 i 14 es manifesta l'increment de volum que segueix el cicle de desenvolupament oocitari sencer, a partir de les dues femelles en fase de maduració. En les figures 15 i 16 es representa l'augment de diàmetre dels estadis oocitaris i en les figures 17 i 18 la disminució del nombre d'oòcits per gram d'ovari que també segueix el cicle de desenvolupament oocitari en aquestes femelles. Tot i que com era d'esperar, els resultats surten esbiaixats perquè en aquesta fase pràcticament tot l'ovari està ocupat per oòcits vitel·logènics madurs, amb nucli en migració i hidratats. Llavors, els talls histològics s'han de fer a major gruix i és molt més difícil detectar els oòcits en creixement primari.

En la Figura 19, com ja s'ha dit anteriorment, es veu que l'OPD o nombre d'òcits per gram d'ovari de totes les femelles de les dues espècies lògicament disminueix a mesura que es desenvolupen els òcits, però aquesta figura és especialment interessant perquè evidencia que en l'espècie mediterrània hi ha més varietat simultània d'estadis oocitaris, en canvi, en l'espècie atlàntica hi predomina un sol tipus d'estadi, aspecte que finalment es ressalta en la Figura 20. Aquests resultats indiquen que el desenvolupament oocitari es dona d'una forma més continuada en *Molva macrophthalma* que en *Molva dypterygia*. Així doncs, s'observa, per exemple, com l'espècie mediterrània té un nombre semblant d'òcits en estadi d'alvèols corticals i vitel·logènic I, el qual és de 35% i 45% respectivament. En canvi, l'espècie atlàntica, experimenta un major nombre d'òcits en estadi d'alvèols corticals, concretament de 61% i el nombre de vitel·logènics I que posseeix és molt inferior, de 21%.

Se sap que diverses senyals exògenes interactuen en el control del temps i la durada de la posta (Serrat et al., in press). Específicament, la temperatura afecta la velocitat del desenvolupament gonadal, de manera que s'espera que les espècies d'aigües més càlides assoleixin l'estadi capaç de reproduir-se abans que les d'aigües més fredes (Lowerre-Barbieri et al., 2011). A més a més, també afecta, com ja s'ha dit, a la durada de l'època de posta, la qual s'espera que sigui més curta en les zones més fredes que en les càlides. Això es pot veure en la Figura 19 i 20 on, l'espècie atlàntica té gairebé tots els òcits concentrats en l'estadi d'alvèols corticals, invertint la seva energia en un nombre major d'ous per lot en una temporada de posta més curta, mentre que l'espècie mediterrània té òcits en diversos estadis de desenvolupament en quantitats semblants, que anirà desenvolupant al llarg d'un període de posta més llarg.

Per tant, els resultats suggereixen que *Molva macrophthalma* va desenvolupant els òcits de manera més continuada per anar formant els ous que anirà alliberant en diferents postes, mentre que *Molva dypterygia* té un reservori d'òcits en estadi d'alvèols corticals que es desenvoluparan de forma més sincrònica per tal de poder ser alliberats durant un període de temps més curt.

En resum, aquest estudi ha demostrat que el volum oocitari augmenta a mesura que es van desenvolupant els òcits en les dues espècies. *Molva macrophthalma*, però, consta d'òcits en estadi de cromatina-nucleolar i d'alvèols corticals més voluminosos en comparació amb *Molva dypterygia*, tot i que disposa d'un menor nombre d'òcits per gram d'ovari. Aquests resultats podrien ser conseqüència de les condicions ambientals de l'hàbitat on es troba l'espècie mediterrània, ja que el Golf de Lleó és una zona d'alta productivitat i, per tant, pot destinar més energia a elaborar ous de més qualitat, però en menor quantitat. L'estudi també apunta que la temperatura pot fer variar la durada del període de posta i l'estratègia reproductiva, fent que *Molva macrophthalma* desenvolupi òcits continuadament, alliberant els ous durant un període més llarg i *Molva dypterygia*, la qual es troba en una zona més freda, desenvolupi de manera sincrònica el reservori d'òcits en estadi d'alvèols corticals per alliberar-los en un període breu. Es recomanen estudis similars amb un nombre major de mostres per aconseguir més informació sobre la resta d'estadis oocitaris i poder comprendre millor la biologia d'aquestes espècies i s'aconsella dur a terme futurs estudis que relacionin aquestes espècies amb el canvi climàtic, ja que es podrien veure fortament afectades per l'augment de temperatura de l'aigua.

## 6. CONCLUSIONS:

The results of this study show that:

- The volume of the oocytes increases during its development in both species, as expected.
- *Molva macrophthalma* has chromatin-nucleolar and cortical alveoli oocytes more voluminous than *Molva dypterygia*, probably due to the high productivity of the habitat where it lives. However, the Mediterranean species has less number of oocytes per gram of ovary than the Atlantic species. Therefore, *Molva macrophthalma* uses the energy to develop quality oocytes, but in less quantity, whereas *Molva dypterygia* does the opposite.
- The duration of the spawning period of *Molva dypterygia* is shorter than in *Molva macrophthalma*, owing to the fact of the different temperature of the water.
- The Mediterranean *Molva macrophthalma* develops its oocytes continuously, releasing the eggs during a long spawning period, whereas the Atlantic *Molva dypterygia* develops them from its stock of cortical alveoli oocytes synchronously during a short spawning period.

## 7. BIBLIOGRAFIA:

Bănaru, D., Mellon-Duval, C., Roos, D., Bigot, J.L., Souplet, A., Jadaud, A., Beaubrun, P. & Fromentin, J.M. (2013). Trophic structure in the Gulf of Lions marine ecosystem (north-western Mediterranean Sea) and fishing impacts. *Journal of Marine Systems* 111–112, 45–68.

Bosc E., Bricaud A. & Antoine D. (2004). Seasonal and interannual variability in algal biomass and primary production in the Mediterranean Sea, as derived from 4 years of SeaWiFS observations. *Global Biogeochemical Cycles* 18, 1–17.

Brown-Peterson, N.J., Wyanski, D.M., Saborido-Rey, F., Macewicz, B.J. & Lowerre-Barbieri, S.K. (2011). A standardized terminology for describing reproductive development in fishes. *Marine and Coastal Fisheries*, 3(1): 52-70.

Castro, L.R., Claramunt, G., Krautz, M.C., Llanos-Rivera, A. & Moreno, P. (2009). Egg trait variation in anchoveta *Engraulis ringens*: a maternal response to changing environmental conditions in contrasting spawning habitats. *Marine Ecology Progress Series* 381, 237–248.

Cheung, W.W.L., Pitcher, T.J. & Pauly, D. (2005). A fuzzy logic expert system to estimate intrinsic extinction vulnerabilities of marine fishes to fishing. *Biol. Conserv.* 124:97-111.

Cohen, D. M. (Ed.). (1989). *Papers on the systematics of gadiform fishes*. Nat. Hist. Mus. Los Angeles Cty., Sci. Ser. 32. 262 pp.

Cohen, D.M., Inada, T., Iwamoto, T. & Scialabba, N. (1990). *FAO species catalogue. Vol. 10. Gadiform fishes of the world (Order Gadiformes). An annotated and illustrated catalogue of cods, hakes, grenadiers and other gadiform fishes known to date*. FAO, Rome.

Conover D.O. (1985) Field and laboratory assessment of patterns in fecundity of a multiple spawning fish: the Atlantic silverside *Menidia menidia*. *Fishery Bulletin* 83, 331–341.

Emerson, L.S., Greer-Walker, M. & Witthames, P.R. (1990). A stereological method forestimating fish fecundity. *J. Fish Biol.* 36, 721–730.

Endo, H. (2002). Phylogeny of the order Gadiformes (Teleostei, Paracanthopterygii). *Mem. Grad. School Fish. Sci. Hokkaido Univ.* 49(2):75–149.

Fraser-Brunner, A. & Palmer, G. (1951). The gadid fishes of the genus *Molva*. *Ann.Mag.Nat.Hist.*, (12) 4: 188-92.

Froese, R., Thorson, J. & Reyes, R.B. Jr. (2013). A Bayesian approach for estimating length-weight relationships in fishes. *J. Appl. Ichthyol.* (2013):1-7.

Fulton, T. W. (1898). On the growth and maturation of the ovarian eggs in teleosts. Fisheries Board of Scotland 16th Annual Report, Part 3: 88 – 124.

Greer-Walker, M., Witthames, P., & Bautista de los Santos, I. (1994). Is the fecundity of the Atlantic mackerel (*Scomber scombrus*: Scombridae) determinate? *Sarsia* 79:13–26.

Guraya, S. S. (1986). *The cell and molecular biology of fish oogenesis*. Karger, Basel.

Heins, D.C., Baker, J.A. & Guill, J.M. (2004). Seasonal and interannual components of intrapopulation variation in clutch size and egg size of a darter. *Ecology of Freshwater Fish* 13, 258–265.

Hunter, J.R., Macewicz, B.J. & Kimbrell, C.A. (1989). Fecundity and other aspects of the reproduction of sablefish *Anoplopoma fimbria* in central Californian waters. *Calif. Coop. Ocean. Fish. Investig. Rep.* 30, 61–72.

Hunter, J.R., Macewicz, B. J., Lo, N. C. & Kimbrell, C. A. (1992). Fecundity, spawning, and maturity of female Dover sole *Microstomus pacificus*, with an evaluation of assumptions and precision. *U.S. National Marine Fisheries Service Fishery Bulletin* 90:101–128.

Kjesbu, O.S., Witthames, P.R., Solemdal, P. & Greer-Walker, M. (1990). Ovulatory rhythm and a method to determine the stage of spawning in Atlantic cod (*Gadus morhua*). *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 47: 1185–1193.

Klibansky, N. & Juanes, F. (2008). Procedures for efficiently producing high-quality fecundity data on a small budget. *Fish. Res.* 89, 84–89.

Kock L. & Lambert K. (1974). “Investigations by the German Democratic Republic on the ling (*Molvabyrkelange* walls) in September 1973 east on the Faeroes”. *Annals Biol. Copenhagen*.31. pp. 115-116.

Korta, M., Murua, H., Kurita, Y. & Kjesbu, O.S. (2010). How are oocytes recruited in a indeterminate fish? Applications of stereological techniques along with advanced packing density theory on European hake (*Merluccius merluccius* L.). *Fish Res* 104:56-63.

Kurita, Y. & Kjesbu, O.S. (2009). Fecundity estimation by oocyte packing density formulae in determinate and indeterminate spawners: theoretical considerations and applications. *Journal of Sea Research*. 61: 188–196.

Leal E.M., Castro L.R. & Claramunt G. (2009). Variability in oocyte size and batch fecundity in anchoveta (*Engraulis ringens*, Jenyns 1842) from two spawning areas off the Chilean coast. *Scientia Marina* 73, 59–66.

Lowerre-Barbieri, S.K., Brown-Peterson, N.J., Murua, H., Tomkiewicz, J., Wyanski, D.M. & Saborido-Rey, F. (2011). Emerging Issues and Methodological Advances in Fisheries Reproductive Biology. *Marine and Coastal Fisheries*, 3(1), 32–51.

Macpherson, E. (1979). Relations trophiques des poissons dans la Méditerranée occidentale. *Rapp. Comm. Int. Explor. Sci. Mer Méditerr.* 25/26, 49-58.

Moguedet. (1987). Approche de la Dynamique de Stocks accessoires: le Cas des Lingues (*Molvaspp.*) exploitées par la Flottille industrielle Lorientaise”. *Université des Sciences et Techniques de Lille Flandre Artois, Lille*. 301 pp.

Muñoz, M. (2000). *Biologia de la reproducció d’alguns escorpeniformes del Mediterrani occidental (Pisces, Teleostei)*. Universitat de Girona.

Murua, H. & Saborido-Rey, F. (2003). Female reproductive strategies of marine fish species of the North Atlantic. *Journal of Northwest Atlantic Fishery Science* 33:23–31.

Murua H., Lucio P., Santurtu'n M. & Motos L. (2006). Seasonal variation in egg production and batch fecundity of European hake *Merluccius merluccius* (L.) in the Bay of Biscay. *Journal of Fish Biology* 69, 1304–1316.

Mytilineou, C., C.-Y. Politou, C. Papaconstantinou, S. Kavadas, G. D'Onghia & L. Sion. (2005). Deep-water fish fauna in the Eastern Ionian Sea. *Belg. J. Zool.*, 135(2):229-233.

Papasissi, C. (2008). *Molva macrophthalmalma* Spanish Ling. Recuperat de <http://www.fishbase.se/summary/1733>

Saber, S., Macías, D., Urbina, J.O. & Kjesbu, O.S. (2016). Contrasting batch fecundity estimates of albacore (*Thunnus alalunga*), an indeterminate spawner, by different laboratory techniques. *Fisheries Research*, 176, 76-85. doi: 10.1016/j.fishres.2015.12.013

Schneider, C., Rasband, W. & Eliceiri, K. (2012). NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nature methods*.

Serrat, A., Muñoz, M. & Lloret, J. (in press). Condition and reproduction of the Mediterranean *Argentina sphyraena*, a temperat species in the context of sea warming.

Svetovidov, A.N. (1986). Review of the three-bearded rocklings of the genus *Gaidropsarus* Rafinesque, 1810 (Gadidae) with description of a new species. *Journal of Ichthyology*, 62(1):115-35 (transl. of an article in *Voprosy*).

Tanasichuk, R. & Ware, D. (1987). Influence of interannual variations in winter sea temperature on fecundity and egg size in Pacific herring (*Clupea herengus pallasii*). *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 44, 1485–1495.

Thorsen, A. & Kjesbu, O.S. (2001). A rapid method for estimation of oocyte size and potential fecundity in Atlantic cod using a computer-aided particle analysis system, *Journal of Sea Research*. 46: 295–308.

Weibel, E.R. & Gomez, D.M. (1962). A principle for counting tissue structures on random sections. *Journal of Applied Physiology*, 17: 343–348.

Weibel, E. R. (1979). *Stereological methods*. Vol. 1: Practical methods for biological morphometry. Academic Press, London.

Witthames, P.R., Thorsen, A., Fonn, M., Greenwood, L.N., Saborido-Rey, F., Dominguez, R., Murua, H., Korta, M. & Kjesbu, O.S. (in press). Advances in fecundity methodology applied to some marine fish. *Fish. Bull.*