



Estudi de la biologia reproductiva de la cabra de mar, *Maja brachydactyla*: aparell reproductor i qualitat de les postes en captivitat

Carles Garcia Simeó

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.tdx.cat) 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.tdx.cat) 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.tdx.cat) 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.

**Estudi de la biologia reproductiva
de la cabra de mar, *Maja brachydactyla*:
aparell reproductor i qualitat
de les postes en captivitat.**

CARLES GARCIA SIMEÓ

Departament de Biologia Cel·lular,
Facultat de Biologia, Universitat de Barcelona

Programa de doctorat d'Aqüicultura, bienni 2005-2007
Tesi realitzada a l'IRTA Sant Carles de la Ràpita

Directora de tesi

Dra. Guiomar Rotllant

Programa Aqüicultura
Subprograma de Cultius Aqüícoles
IRTA Sant Carles de la Ràpita

Tutor

Dr. Enric Ribes

Departament de Biologia Cel·lular
Facultat de Biologia
Universitat de Barcelona

Materials i mètodes

1. Origen dels animals

Les cabres de mar, *Maja brachydactyla*, foren capturades en la Ria d'A Coruña per la flota artesanal amb arts menors d'emmallat o nanses (Figura 5). Els exemplars eren adults, donat que la longitud de closca superava en tots els casos la talla mínima de 120 mil·límetres establerta per les regulacions de la pesca comercial de la que provenien. Les cabres de mar foren transportades en sec, a baixa temperatura (8°C) i alta humitat per carretera fins les instal·lacions de l'IRTA Sant Carles de la Ràpita, on bé foren dissecades per a l'extracció de teixits o distribuïdes aleatòriament en els tancs de 2.000 litres connectats a un sistema de recirculació per a l'aclimatació a condicions de captivitat i realització dels experiments de factors ambientals.

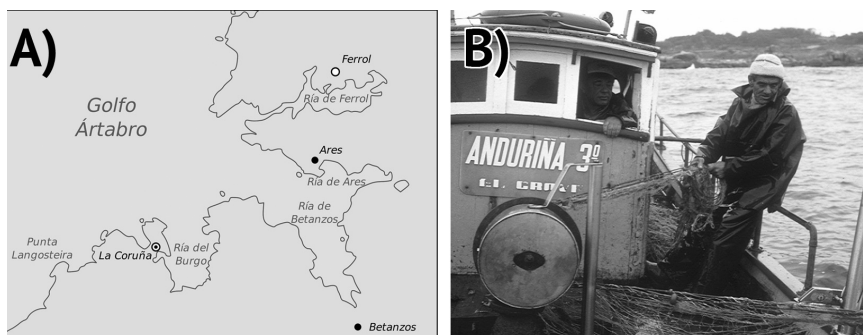


Figura 5. A) Les cabres de mar foren capturades a la Ria d'A Coruña, que apareix en aquest mapa com Ria del Burgo, dintre del Golf d'Ártabro, Galícia. B) Embarcació de pesca artesanal arriant un tresmall.

2. Mètode de cultiu

Els reproductors es van mantenir en tancs de 2.000 litres connectats a una unitat de recirculació IRTAmar™ que controlava i regulava automàticament la temperatura (18°C), cabal i els nivells d'oxigen (Figura 6). A més a més, la temperatura, nivells d'oxigen dissolt, pH i salinitat foren mesurats diàriament i, els nivells de nitrats i nitrats setmanalment. Els reproductors es van alimentar a societat amb musclo fresc (*Mytilus* sp.) i cranc congelat (*Liocarcinus depurator*) en dies alternatius, i les restes de menjar es retiraven diàriament.

La presència de larves acabades de descloure en els recol·lectors de larves connectats als tancs dels reproductors es revisava diàriament. En cas de que

hi hagueren larves, aquestes es rentaven per eliminar restes de l'eclosió i es transferien a un volum de 10 litres per a l'estimació del nombre de larves. L'estimació es realitzava volumètricament, calculant la mitjana del nombre de larves presents en 5 rèpliques de 10 mil·lilitres.

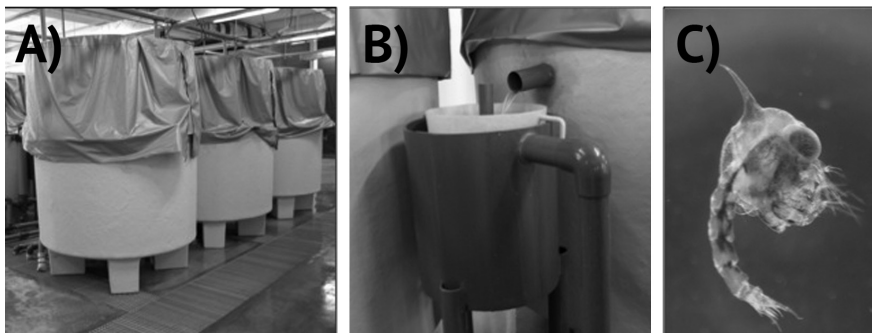


Figura 6. A) Tancs de reproductors. B) Col·lectors de larves acabades de descloure associats als tancs de reproductors. C) Larva acabada de descloure de la cabra de mar.

L'estimació del pes sec individual de les larves es realitzava a partir de 3 rèpliques de 200 larves contades manualment, filtrades i rentades amb aigua salada i destil·lada, i eixugades amb paper secant. Les mostres per a l'anàlisi bioquímica proximal es processaven com el descrit abans, i es guardaven a -80°C fins que es realitzaven les anàlisis.

En cas de que els experiments requeriren el cultiu larvari, es van seguir els protocols d'Andrés et al. (2007). Les larves acabades de descloure (60 larves per litre) es van transferir a cistelles cilíndriques de PVC de 35 litres de volum i base de fons de malla ($150\ \mu\text{m}$) amb suficient aireació per a la renovació de l'aigua. Els cilindres es van submergir en un tanc de 1.500 litres amb condicions constants de temperatura (18°C), i salinitat i fotoperíode natural. Els metanauplius d'*Artemia* sp. foren enriquits amb EasySelco (INVE) d'acord amb les instruccions del fabricant. Les larves foren alimentades a una proporció de 60 metanauplis per larva segons Andrés et al. (2007). Al llarg del cultiu es van afegir *Tetraselmis chuii* i *Isochrysis galbana* cada dos dies per mantenir les aigües verdes. Els mostres de les larves es van realitzar el dia de l'inici del cultiu (zoea 1), els dies d'intermuda de la zoea 2 i megalopa corresponent als dies 8 i 12 després de l'eclosió, i a dia 18 per al primer estadi de cranc.

3. Histologia

Les mostres de l'aparell reproductor masculí es van fixar mitjançant tècniques estàndard de microscòpia òptica i electrònica. En el cas de la microscòpia òptica, els fragments de les diferents regions de l'aparell reproductor es van fixar utilitzant el fixador de Bouin durant 24-48 hores en funció de la mida de la mostra. Les mostres foren rentades i guardades en etanol al 70% fins el seu processat. La inclusió en blocs de parafina es realitzà mitjançant una sèrie d'alcohol de 70%, 96% i 100%, seguida d'un rentat en etanol 100%: xilè (1:1) i xilè absolut i dos banys de parafina. Els blocs es tallaren en seccions de 3 µm, les quals foren tenyides amb hematoxilina-eosina i la tinció de Mallory.

Les mostres de microscòpia electrònica de transmissió i rastreig foren extretes i fixades en una barreja de 2% paraformaldehid i 2,5% glutaraldehid en tampó cacodilat (0,1 M, ph 7,4) durant 24 hores a 4°C. Seguidament, les mostres es van rentar amb el tampó cacodilat, van ser postfixades amb 1% de tetraòxid d'osmi en tampó cacodilat, i es van tornar a rentar amb tampó cacodilat. Les mostres per a microscòpia electrònica de transmissió es van deshidratar amb una sèrie creixent d'acetona (30%, 50%, 70%, 90%, 95% i 100%) i s'inclogueren en la resina de Spurr. Les seccions ultrafines (40 a 80 nm) es van contrastar amb acetat d'uranil i citrat de plom. Les observacions es van realitzar amb un microscopi Jeol EM-1010 a 80kV. Les mostres per microscòpia electrònica de rastreig es van deshidratar amb una sèrie creixent d'etanol (30%, 50%, 70%, 90%, 95% i 100%), es van assecar al punt crític amb CO₂ i es varen recobrir amb una capa d'or-pal·ladi de 20 a 50 nm de gruix. Les observacions es van realitzar amb un microscopi Hitachi S-2300 a 10-15 kV.

4. Biologia molecular

Les mostres de teixits adults (gònades, hepatopàncrees, brànquies i cor) per a biologia molecular es van extreure i congelar immediatament a -80°C, mentre que la musculatura dels pereopodis es va fixar en etanol absolut a 4°C fins el seu processat. Les mostres de larves provenien de tres cultius larvaris diferents, en els quals es va mostrejar la larva acabada de descloure (zoea 1), els estadis intermuda de zoea 2 i megalopa, i el primer estadi juvenil. Les postes es pesaren, rentaren en aigua destil·lada i congelaren a -80°C.

L'extracció del RNA es va realitzar utilitzant TRIZOL (Invitrogen) seguint les instruccions del fabricant. La concentració i puresa del RNA es va determinar amb la mesura de la densitat òptica a 260 nm i 280 nm per espectrofotometria, i la integritat es va visualitzar per electroforesi d'un gel desnaturalitzant amb agarosa TAE (Tris-Acetate-EDTA).

La síntesi de DNA complementari es va realitzar a partir d'un microgram de RNA amb Superscript First-strand Synthesis kit for RT PCR (Invitrogen) seguint les instruccions del fabricant. A més, les mostres per a quantificació de l'expressió del gen es van tractar amb DNA-free (Ambion) per eliminar traces de DNA genòmic.

L'aïllament del gen homòleg a *vasa* en la cabra de mar es va realitzar mitjançant PCR (reacció en cadena de la polimerasa) amb encebadors degenerats dissenyats en base a l'alineament d'altres gens homòlegs en invertebrats. Els productes de la PCR foren clonats en un vector pCR 2.1-TOPO (TOPO-TA cloning kit, Invitrogen) i les seqüències dels clons es varen analitzar en un laboratori extern. El DNA genòmic es va extraure de la musculatura utilitzant DNeasy Blood & Tissue kit (QIAGEN) i l'amplificació es va realitzar mitjançant una PCR.

L'especificitat de l'expressió del gen *Mb vasa* en els teixits dels adults es va determinar mitjançant PCR amb encebadors específics, utilitzant el gen *β -actina* com gen endogen. L'expressió de *Mb vasa* en els estadis larvaris i primer juvenil es va estimar per PCR quantitativa utilitzant el reactiu SYBR green (Applied Biosystems) en un termociclador ABI 7300 amb encebadors específics.

5. Bioquímica: anàlisi proximals

Les mostres de larves acabades de descloure i dels teixits de reproductors per a l'anàlisi proximal de proteïnes, carbohidrats i lípids es van homogeneïtzar mitjançant trituració i sonicació. El contingut de proteïnes i carbohidrats es va estimar per triplicat amb el mètode colorimètric de Bradford (1976) i Dubois et al. (1956) respectivament. Les mostres de proteïnes es van digerir amb NaOH. Els lípids es van extraure segons el mètode de Folch et al. (1957) i es van quantificar per gravimetria.

