



Mellora dun protocolo de fecundación *in vitro* de gametos de lapa *Patella vulgata*

Mejora de un protocolo de fecundación *in vitro* de gametos de lapa *Patella vulgata*

Improvement of a protocol for *in vitro* fertilization of gametes of limpet *Patella vulgata*



Facultade de Ciencias
Departamento de Bioloxía Animal
Área de Zooloxía

Regina Pabst Fernández
Traballo de Fin de Grao

Data da Defensa: 29 de xuño de 2015

Dirixido pola Dra. Nuria Fernández Rodríguez

01 Resumen / Summary

1.1 Resumen

1.2 Summary

02 Introducción, objetivo y antecedentes

03 Material y Métodos

3.1 Trabajo de campo: recolección de reproductores

3.2 Trabajo de laboratorio:

- Selección de reproductores: identificación del sexo y estadio de madurez gonadal.
- Protocolo de fecundación in vitro: pruebas de estandarización realizadas.

04 Resultados y discusión

05 Conclusiones / Conclusions

5.1 Conclusiones

5.2 Conclusions

06 Otras pruebas realizadas

07 Bibliografía

1.1 Resumen

P. vulgata es un molusco gasterópodo que vive en las rocas del intermareal medio de aguas templadas. Esta especie se reproduce en otoño/invierno, teniendo una puesta principal en Diciembre/ Febrero. En este estudio nos centraremos en la mejora de los parámetros que condicionan la fecundación *in vitro* de dicha especie en el laboratorio, para poder obtener el mayor éxito en la embriogénesis, es decir, el mayor porcentaje de larvas normales al final del proceso.

Para obtener dichos resultados hemos trabajado con diferentes parámetros, concluyendo que los parámetros que favorecen el éxito en la fecundación *in vitro* son la alcalinización de los ovocitos con NH₄OH durante 10 minutos a pH 9, la activación de los espermatozoides durante 45 minutos en agua de mar, un tiempo de fecundación de 180 minutos y la incubación de los embriones durante 24 horas a 18°C.

1.2 Summary

P. vulgata is a gastropod mollusk that lives in the rocks of the mid intertidal zone in temperate waters. This species is autumn / winter breeder, and have a principal spawn in December/February. In this study we have focused on the optimization of the parameters that determine the *in vitro* fertilization success of the above mentioned species, aimed for obtaining maximum percentage of normal larvae at the end of the incubation period. Moreover, we have conducted an experiment to condition limpets of the species *P.vulgata* aimed for maintaining mature individuals, out of the reproductive natural breeding period.

To obtain these results we worked with different parameters. We have concluded that the parameters that favor *in vitro* fertilization are alkalization of oocytes with NH₄OH for 10 minutes at pH 9, sperm activation for 45 minutes in sea water, 180 minutes of fertilization time and 24 hours of incubation of embryos at 18°C.

02

INTRODUCCIÓN, OBJETIVO Y ANTECEDENTES



Para la realización del protocolo trabajaremos con lapas del género *Patella*, concretamente con la especie *P.vulgata*. Las lapas son moluscos gasterópodos, que en nuestro caso pertenecen a la familia *Patellidae*. Son organismos que viven fijos al sustrato del intermareal rocoso, alimentándose principalmente raspando la materia orgánica de las rocas y algas sobre las que viven. En los intermareales rocosos de Galicia podemos encontrar tres especies: *P.vulgata*, *P.ulyssiponensis* y *P.depressa*.

P. vulgata y *P. depressa* habitan ampliamente las costas Atlánticas continentales. La primera de ellas es una especie de distribución templado/boreal que se extiende desde el Sur de Portugal hasta el Norte de Noruega, mientras que *P. depressa* tiene una distribución templado/lusitana y se localiza más al Sur, desde Senegal hasta Gales. *P. ulyssiponensis* presenta una distribución más amplia, extendiéndose desde el Mediterráneo y África del Norte hasta el Sur de Noruega y el Mar del Norte (Ribeiro et al, 2009).

La fecundación de estos moluscos se produce externamente, las larvas primero son de tipo trocófora y después pasan a ser de tipo veliger (Fig.10), pasando sus primeros días de vida en la columna de agua, después de lo cual se asientan en la orilla. La vida promedio varía pero se encuentra entre 10 y 20 años.

Para establecer el protocolo de fecundación *in vitro*, nos hemos basado en los dos estudios publicados sobre fecundación *in vitro* realizados con la especie *P.vulgata*, que nos sirvieron como orientación en muchos de los aspectos que comentaremos después.

Por un lado, Hodgson et al. (2006) realizaron un trabajo sobre los factores que afectan a la fertilización y los modelos de desarrollo del mismo. En él, asentaron características clave como que el éxito de la fecundación se fundamenta en tres variables que son: concentración de esperma, edad de los gametos y tiempo de contacto de los mismos durante la fecundación. Obtuvieron resultados óptimos con 10 minutos de alcalinización de los huevos a pH 9, una concentración de esperma de 106 espermatozoides/ml, un tiempo de contacto entre los gametos de entre 15 y 30 minutos y un tiempo de incubación superior a 12 horas.

Por otro lado, Aquino de Souza et al. (2009) publicaron un trabajo sobre la necesidad de una maduración artificial de los ovocitos de *P.vulgata* y *P.depressa* previamente a la fecundación, exponiendo los ovocitos a agua de mar alcalinizada con NaOH, obteniendo como conclusiones que la maduración de los ovocitos con agua alcalinizada con NaOH y a un pH 9.5 mejoraba las tasas de fertilización *in vitro*, especialmente con concentraciones altas de espermatozoides (106 espermatozoides/ml), mientras que a pH 9 o 10 los resultados no mejoraban.

Las pruebas de fecundación se desarrollaron durante los meses de Octubre de 2014 a Enero de 2015 y han tenido como objetivo principal estandarizar un protocolo de fecundación *in vitro* y desarrollo embrionario con esta especie de *Patella*. Para ello, basándonos en resultados obtenidos por los autores antes citados, hemos realizado varias pruebas para la optimización de los siguientes parámetros:

1. El tiempo y pH de alcalinización de los ovocitos, para su maduración previamente a la fecundación.
2. El tiempo de activación del esperma.
3. El tiempo y temperatura de fecundación.
4. El tiempo y temperatura de incubación de los embriones.

03

MATERIAL Y MÉTODOS



- *Patella depressa*: Concha cónica y redonda de color pardo grisáceo, con bordes irregulares. Ápice de color amarillo-naranja, no centrado. Cara interna jaspeada a rayas de color chocolate y amarillo con iridiscencias azules. Pié de color gris oscuro, a veces naranja, con cilios iridiscentes muy visibles (Fig.3).

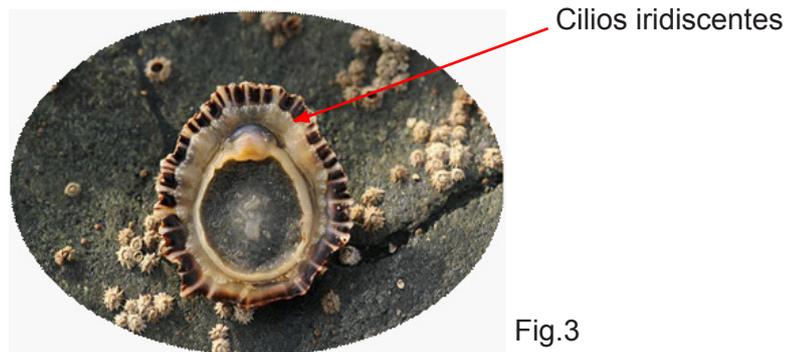


Fig.3

- *Patella ulyssiponiensis*: Concha ovalada, de poca altura de contorno aserrado, generalmente oculto bajo algas y organismos epífitos. Cara interna de color blanco a veces con manchas amarillas a la altura del ápice. Pié de color amarillo o naranja (Fig.4).



Fig.4

- Material: Para poder realizar la recolección de los individuos necesitamos:
 - Navaja plana
 - Trapos húmedos para conservar a los ejemplares en un ambiente correcto.
 - Botas y traje especializado
 - Bolsas zip para separar las 3 especies

- Proceso de recolección:

Para cada prueba de fecundación se recogieron aproximadamente unos 50 individuos de *P.vulgata*.

Para separar la lapa de las rocas, insertamos la hoja del cuchillo por el borde de la concha que se halla pegado al sustrato (roca), con cuidado de no dañar al organismo. Tras esto realizamos una suave presión, haciendo palanca hacia abajo y hacia arriba, con el fin de despegar el pie. Nos aseguramos de no haber dañado al individuo observando el estado del pie, pues nos interesa conservar vivos los ejemplares hasta la extracción de los óvulos o espermatozoides. Inmediatamente después, envolvemos las lapas con el paño humedecido con agua de mar para evitar su desecación y los metemos en una bolsa zip.

Trasladamos los ejemplares en frío al laboratorio, manteniéndolos en la nevera a una temperatura de entre 4 y 8°C hasta su utilización.

3.2 Trabajo en el laboratorio

- Selección de individuos reproductores:** identificación del sexo y del estadio gonadal.

El primer paso para la selección de individuos maduros, es saber su sexo, para posteriormente proceder a abrirlos y observar el tamaño y volumen de su gónada y en base a este, determinar el estado de madurez gonadal (Orton et al 1956).

Todo el proceso se realiza en frío, colocando hielo debajo de las bandejas donde vamos a trabajar con los ejemplares. Para ello, con la ayuda de un elemento punzante, realizamos una pequeña incisión sobre el pie de la lapa a la altura de la gónada (Fig.5). Si la sustancia que sale es naranja o blanco crema, sabremos que es macho, mientras que si la sustancia es verde o parda, se trata de una hembra.

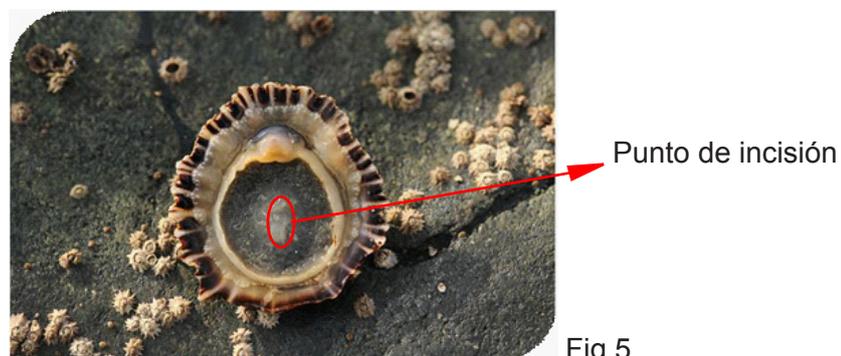


Fig.5

Tras verificar el sexo, abriremos el pie de cada lapa con la finalidad de tener acceso a la gónada del individuo, para elegir los individuos con gónadas más maduras y extraer los gametos que utilizaremos para realizar las pruebas de fecundación *in vitro*. Abriremos en primera instancia las hembras, manteniendo a los machos en la nevera hasta el momento de su uso.

Cómo veremos en el protocolo general de fecundación *in vitro* (apartado siguiente) previamente a la fecundación debemos facilitar artificialmente la maduración de los ovocitos. Para ello, primero hemos de extraer estos de las hembras y exponerlos a una solución alcalina. Tras esto, podremos proceder a la extracción de los gametos masculinos para realizar la fecundación. Los gametos masculinos tienen un tiempo de vida limitado por la temperatura y la oxidación, por eso no podemos abrir ambos sexos a la vez.

Para separar el pie se sigue el siguiente proceso: en frío, ordenamos los individuos boca arriba (Fig.6). Para retirar el pie, con la ayuda de un bisturí realizamos una incisión cuidadosa pero profunda sobre el lateral izquierdo del animal (al lado de la cabeza) continuando por toda la periferia del pie hasta llegar al extremo opuesto de la cabeza (lado derecho del animal). De esta manera podemos separar el pie sin dañar la gónada (Fig.7).



Fig.6

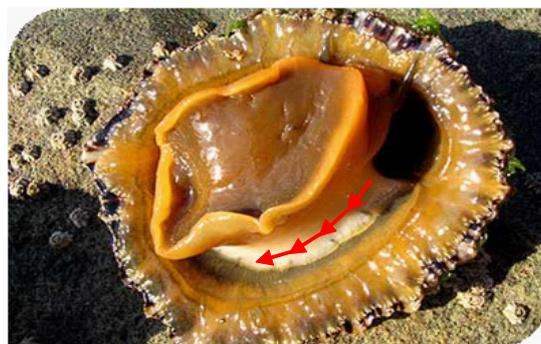


Fig.7

Basándonos en los estadios gonadales I-V (Fig.8) propuestos por Orton (1956) se utilizan únicamente las hembras con una gónada más desarrollada. Durante las primeras pruebas se utilizaron hembras en los estadios IV y V, pero tras comprobar que los porcentajes de larvas normales son superiores en hembras en estadio V, en las pruebas sucesivas se emplearon exclusivamente hembras en este estadio.

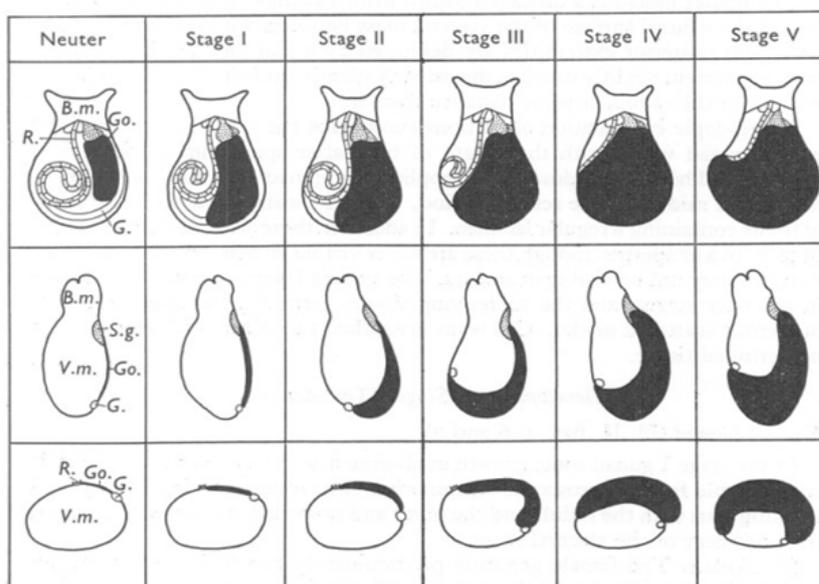


Fig.8. *Patella vulgata*: representaciones semi-diagramáticas de los estados en el desarrollo de la gónada. En la fila superior: gónada, masa visceral y aparato bucal vista desde abajo, después de retirar el pie. En la fila del medio: sección longitudinal de la región bucal y masa visceral que pasa por la región central de la gónada, plano de la sección paralela al eje longitudinal del cuerpo. En la fila inferior: sección transversal de la masa visceral por la región más amplia de la gónada, plano de la sección paralela al eje transversal del cuerpo.

- Estadío 0: Gónada sin desarrollar. Color amarronado, sexo indistinguible.
- Estadío I: Comienza el desarrollo.
- Estadío II: Desarrollo de la gónada hasta 1/3 de su tamaño máximo, cubriendo el borde de la masa visceral.
- Estadío III: Entre 1/3 y 2/3 de la talla máxima. Se ve un aumento considerable del volumen de la gónada respecto al estadio II.
- Estadío IV: Crecimiento mayor de 2/3 del tamaño máximo. Comienza a ocupar parte de la parte dorsal de la masa visceral
- Estadío V: Gónada totalmente desarrollada, cubriendo enteramente la parte ventral y gran parte dorsal de la masa visceral.

- **Protocolo general de fecundación *in vitro*:**

Todo el proceso de recolección de gametos y fecundación se realiza en laboratorio acondicionado a una temperatura estable de 23°C. El agua de mar utilizada en todos los pasos es agua de mar filtrada a 0,35 micras y UV, recogida en las instalaciones del Acuario de A Coruña.

Se explica a continuación el protocolo general de fecundación *in vitro*. Siguiendo este protocolo, hemos realizado varias pruebas para optimizar ciertos parámetros determinantes en la fecundación para la especie *P.vulgata*, teniendo como objetivo obtener el mayor porcentaje posible de larvas normales al final del periodo de incubación.

Previamente a la fecundación *in vitro* es necesario: madurar artificialmente los ovocitos, ya que aunque la gónada se encuentre madura, los ovocitos no son viables hasta que se produce un cambio en el pH (alcalinización, que en la naturaleza sucede de manera normal dentro de la gónada). Los ovocitos se maduran artificialmente exponiéndolos a una solución alcalina con hidróxido amónico NH₄OH en agua de mar (Aquino de Souza et al, 2009). También es necesario activar el esperma poniéndolo en contacto con agua de mar, pues inicialmente los espermatozoides están inmóviles.

Para extraer los ovocitos, realizamos una suave presión sobre la gónada para que se rompa y con una pipeta de plástico y unas gotas de agua de mar se transfieren los ovocitos a un cristizador con agua de mar, donde se lavan (eliminando restos de tejidos gonadales). Entonces se transfieren a una solución de agua de mar alcalinizada (hemos determinado el pH y tiempo óptimos de exposición).

Los ovocitos alcalinizados anteriormente, se filtran y lavan a continuación utilizando una malla de 50 micras (debiendo filtrarse en futuras pruebas con el filtro sumergido en agua de mar para evitar dañarlos) y se transfieren a vasos de 100mL con agua de mar para realizar la fecundación.

Una vez extraídos los ovocitos de las hembras, podemos proceder a la extracción y activación del esperma de los machos.

Se diseccionan todos los machos almacenados en la nevera, y se escogen los 3 individuos con la gónada en estadio más avanzado (IV y V). En estudios anteriores se realizaron varias pruebas de fecundación con diferentes concentraciones de esperma (Hodgson et al. 1996) llegando a la conclusión de que la fecundación con esperma directamente obtenido de la gónada es más exitosa que el uso de diluciones, por lo que con ayuda de una pipeta Pasteur se pipetea una pequeña cantidad de esperma (punta de la pipeta) de cada uno de los 3 machos.

El esperma de *Patella* (Antonio Solé-Cava et al,2013) está inicialmente inactivo por lo que hay que activarlo previamente a la fecundación poniéndolo en contacto con agua de mar (hemos determinado el tiempo óptimo de activación). Transcurrido este tiempo, se procede a la fecundación añadiendo los gametos masculinos al vial de 100 mL que contiene los ovocitos maduros.

Una vez puestos en contacto los gametos masculinos y femeninos, se deja un tiempo (que también hemos optimizado) para que se produzca la fecundación, pudiendo añadir aireación (=agitación) durante la fecundación para que los gametos estén en movimiento constante.

Transcurrido el tiempo de fecundación, los embriones se lavan para eliminar el exceso de esperma, utilizando una malla de 50 micras y sumergiendo el filtro en agua de mar para evitar roturas. A continuación se depositan los embriones en un recipiente de 20 mL.

Después de esto, es necesario estimar el número de embriones que hay en los 100 mL, ya que la incubación de los embriones debe hacerse a una densidad óptima para tener suficientes larvas al final del periodo de incubación, pero no tantas como para que consuman todo el oxígeno y mueran. Usando una cámara de recuento, se estima el número de embriones/mL, haciendo un promedio entre 4 réplicas de 20 microlitros cada una.

Una vez conocida la concentración inicial de embriones, se añade a los recipientes de incubación el volumen necesario para tener una densidad final de 80 embriones/mL en cada uno de los tratamientos que vayamos a probar (Fig.9).

Tras añadir la densidad necesaria de embriones a cada uno de los tratamientos (preparados en recipientes de 20mL) estos se incuban a una determinada temperatura durante un tiempo determinado (parámetros que hemos optimizado) para obtener larvas trocóforas.



Fig 9. Recipientes de incubación para cada tratamiento.

Transcurrido el tiempo de incubación, se realiza el recuento en vivo, con ayuda de la lupa, del porcentaje de larvas normales sobre 4 réplicas de 1 mL.

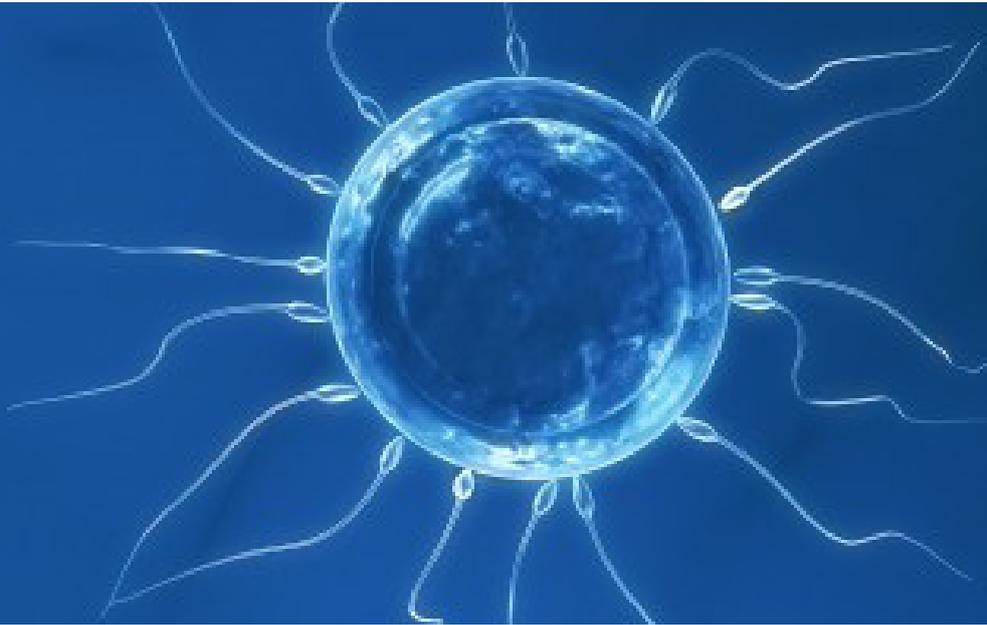
Las larvas normales se diferencian de las anormales principalmente por su morfología y por su movimiento. Las larvas normales presentan una morfología característica (Fig.10) y se mueven rápidamente en todas las direcciones, mientras que las larvas anormales pueden diferir morfológicamente pero la principal diferencia es que apenas se mueven o lo

Tabla 2: Parámetros determinantes en la fecundación y desarrollo embrionario de *P.vulgata*. Se indica cuales fueron objeto de estudio, y los valores experimentales utilizados en la segunda prueba.

Parámetro	Objeto de estudio	Valores
Solución alcalina (base)	NO	NH4OH
pH para maduración <u>ovocitos</u>	SI	9.0, 9.5
Tiempo alcalinización de los <u>ovocitos</u>	SI	10, 20 minutos
Concentración de esperma	NO	Directamente
Activación de esperma	SI	0, 45, 90 min
Tiempo de fecundación	SI	90, 180 min, Sin filtrar
Agitación durante la fecundación	SI	Sólo en 4 réplicas
Concentración de huevos	NO	80 huevos / <u>mL</u>
Temperatura de incubación	NO	18 °C

04

RESULTADOS Y DISCUSIÓN



En la primera prueba el objetivo fue optimizar los valores de pH y tiempo de alcalinización de los ovocitos y la temperatura de incubación de los embriones. Se probaron:

- Tres pH diferentes: 9, 9.5 y 10.
- Tres tiempos de alcalinización: 10 min, 20 min y 40 min.
- Dos temperaturas de incubación: 13°C y 18° C.

La siguiente figura (Fig.11) muestra los porcentajes de larvas normales obtenidas tras alcalinizar los ovocitos a tres pH diferentes (9, 9.5 y 10) durante 10,20 y 40 minutos. Las barras gris claro muestran el % de larvas normales tras la incubación a 13° C. Las barras gris oscuro representan el % de larvas normales tras la incubación a 18°C. Los asteriscos marcan aquellos tratamientos en los que los resultados son claramente diferentes entre las diferentes temperaturas.

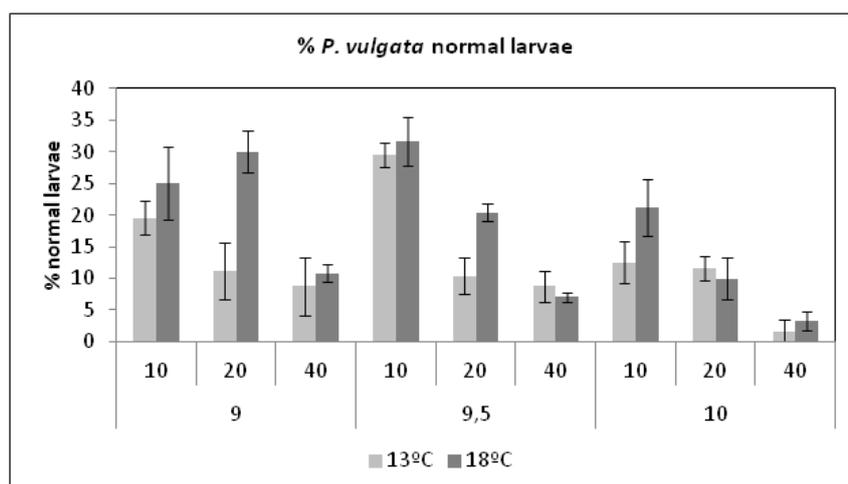


Fig.11

Para cada uno de los parámetros estudiados podemos concluir:

- pH de maduración de los ovocitos: Los mayores porcentajes de desarrollo embrionario se obtuvieron madurando los ovocitos a pH entre 9 y 9.5. PH más altos son nocivos para los ovocitos. No hubo diferencias significativas entre estos dos pH, por lo que en la segunda prueba volvimos a probar ambos parámetros, descartando el pH 10.
- Tiempo de alcalinización de los ovocitos: En general se observa, para todos los pH, que a mayor tiempo de alcalinización se obtiene un menor porcentaje de larvas normales. El pH y el tiempo de alcalinización están relacionados de manera que la maduración de los ovocitos a pH menores requiere mayor tiempo de exposición, y a medida que aumenta el pH, el tiempo de exposición necesario es menor. Sin embargo, a pH 9 las diferencias entre los tiempos de exposición a 10 y 20 minutos no son muy claras, por lo que volvimos a probar ambos parámetros en la segunda prueba, descartando los 40 minutos.
- Temperatura de incubación: Hay diferencias significativas entre las temperaturas de incubación. La temperatura escogida para la incubación es de 18°C pues el número de larvas normales es claramente superior que a 13°C.

En la segunda prueba, una vez determinada la temperatura de incubación a 18° C y acotados los valores óptimos de pH y tiempo de alcalinización de los ovocitos, hicimos las pruebas para optimizar algunos parámetros, probando los valores que se indican en la tabla 2. Los tratamientos resultantes de la combinación de parámetros fueron los siguientes:

PH alcalinización	Tiempo alcalinización (min)	Tiempo activación esperma (min)	Tiempo de fecundación (min)
9.0	10	45	90
9.0	20	45	90
9.0	10	45*	180
9.0	20	45*	180
9.0	10	90	180
9.0	20	90	180
9.5	10	90	180
9.5	20	90	180
9.0	10	Sin activación	180
9.0	20	Sin activación	180
9.5	10	Sin activación	180
9.5	20	Sin activación	180
9.0	10	45	Sin filtrar
9.0	20	45	Sin filtrar
9.5	10	45	Sin filtrar
9.5	20	45	Sin filtrar

* Con agitación durante la fecundación

La siguiente figura (Fig.12) muestra los porcentajes de larvas normales obtenidas tras alcalinizar los ovocitos durante 10 y 20 minutos. Para cada tiempo de alcalinización (10 y 20 min) se hacen tres tratamientos de activación del esperma (45 min, 90 min y sin activación). Para la prueba de activación del esperma a 45 minutos, se hacen además 3 pruebas para el tiempo de fecundación (90 min, 180 min y sin filtrar como se explicó anteriormente) y una réplica con 180 minutos de fecundación y agitación durante la misma. Para las pruebas de activación del esperma de 90 minutos, solo se probó con un tiempo de fecundación de 180 minutos.

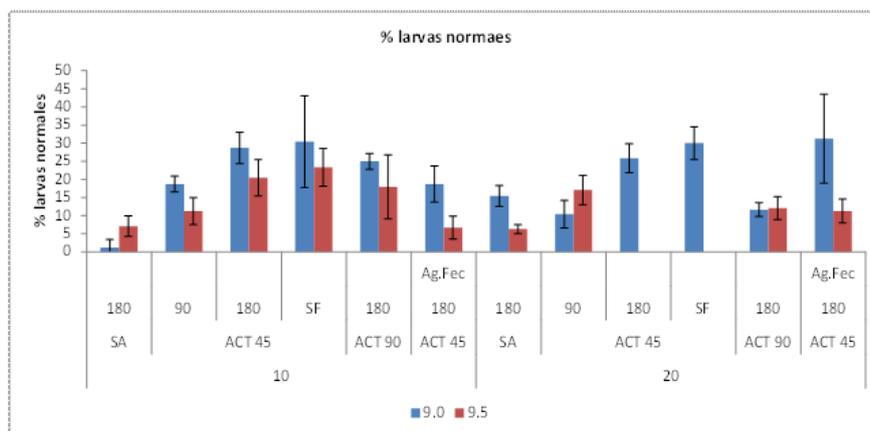


Fig.12

Para cada uno de los tratamientos probados podemos concluir:

- pH de maduración de los ovocitos: Las diferencias entre 9.0 y 9.5 no están claras. Las desviaciones estándar se solapan y no se puede ver diferencias claras, pero si comparamos las medias parece que tanto a 10 como a 20 minutos de tiempo de alcalinización, el pH 9.0 (barras azules en la figura 12) da mejores resultados.
- Tiempo de alcalinización de los ovocitos: No hay claras diferencias entre 10 y 20 minutos (tratamientos a la izquierda y a la derecha de la figura 12), por lo que por la practicidad a la hora de realizar las fecundaciones *in vitro*, utilizaremos un tiempo de alcalinización de 10 minutos a pH 9.
- Tiempo de activación del esperma: La activación del esperma antes de añadirlo a los ovocitos mejora el porcentaje de larvas obtenidas. No observamos diferencias claras entre un tiempo de activación de 45 minutos y uno de 90 minutos, por lo que, por practicidad, recomendamos el periodo más corto: 45 minutos.
- Agitación durante la fecundación: De nuevo no es posible sacar una conclusión clara con respecto al uso de agitación durante la fecundación, por lo que en principio no se recomienda el uso de agitación durante la misma.
- Tiempo de fecundación: Si aumentamos el tiempo de fecundación, mejora el porcentaje de larvas normales (es mejor 180 minutos que 90 minutos). No hay diferencias claras entre el lavado de los embriones al cabo de los 180 minutos (para eliminar el exceso de esperma) y los tratamientos sin lavar, por lo que recomendamos el uso de 180 minutos de fecundación.

Hemos encontrado en la literatura científica solamente dos trabajos similares realizados con *Patella vulgata*.

Por un lado, Hodgson et al. 2007 observaron, al igual que en nuestro caso, que el tiempo y pH óptimos de alcalinización de los ovocitos de *P. vulgata* son 10 minutos a pH 9 utilizando hidróxido amónico. También determinaron que la concentración óptima de esperma era entre 105 y 107 espermatozoides/mL; el tiempo óptimo de contacto entre los gametos era un tiempo superior a 15-30 minutos. Así mismo resultó positivo el uso de agitación durante la fecundación.

Por otro lado Aquino de Souza et al. 2009, observaron que obtenían mejores resultados utilizando como base de alcalinización NaOH a pH 9.5 en lugar de NH₄OH, con un tiempo de alcalinización menor de una hora y una concentración de esperma entre 104 y 106. En pruebas anteriores realizadas en el marco de este proyecto, se obtuvieron también buenos resultados utilizando NaOH, aunque el uso de esta base requiere tiempos mucho mayores de exposición, por lo que decidió utilizarse hidróxido amónico. Por otro lado los trabajos citados no probaron el uso de esperma sin diluir. Como ya se comentó anteriormente, en base a los resultados obtenidos en nuestro experimento y por practicidad decidimos recomendar el uso de esperma sin diluir.

05

CONCLUSIONES



Conclusiones

A partir de los resultados obtenidos recomendamos los siguientes valores para los parámetros analizados, todos elegidos en función del mayor número de larvas normales obtenidos al final del periodo de incubación junto con una mayor practicidad del trabajo experimental:

1. La maduración artificial de los ovocitos de *P.vulgata* debe hacerse con agua de mar alcalinizada con hidróxido amónico a pH 9 durante 10 minutos.
2. Previamente a la fecundación, recomendamos la activación del esperma en agua de mar durante 45 minutos.
3. El tiempo de fecundación óptimo es de 180 minutos.
4. No se recomienda el uso de agitación durante la fecundación puesto que no mejora los resultados.
5. Se recomienda la incubación de los embriones durante 24 horas a una temperatura de incubación a 18°C.

La combinación de estos parámetros permitió obtener el mayor porcentaje de larvas normales obtenida para esta especie (30%).

Conclusions

From the results of all the realized tests we recommend the following values of the analyzed parameters, all chosen aimed for obtaining the maximum percentage of normal larvae at the end of the incubation period:

1. The artificial maturing of the female gametes must be done with sea water alcalized with ammonium hydroxide to pH 9 during 10 minutes.
2. Before the fertilization, we recommend the activation of the sperm in sea water during 45 minutes.
3. The ideal time of fertilization is of 180 minutes.
4. The use of agitation is not recommended during the fertilization since it does not improve the results.
5. It is recommended to incubate the embryos at 18°C during 24 hours.

The combination of these parameters, allowed obtaining the major percentage of normal larvae obtained for this species (30 %).

06

OTRAS PRUEBAS REALIZADAS



Al mismo tiempo que realizamos las pruebas de fecundación *in vitro* con individuos recogidos en el campo, intentamos madurar y mantener los individuos en el laboratorio para poder disponer de reproductores fuera del período reproductivo natural. Para ello, se introdujeron 40 individuos en acuarios de PVC de 12 litros utilizando agua marina procedente del Acuario *Finisterrae* de A Coruña. Este acuario, contaba con dispositivos de filtración para mantener el agua limpia y con dispositivos de aireación (Fig.14). Además se renovaba un 20% del agua diariamente y se realizaba una limpieza completa una vez por semana. Se introdujeron en el acuario rocas y algas marinas (Fig.13) que se renovaban al menos una vez por semana (las algas servían como alimento puesto que las lapas son organismos raspadores, y las rocas como sustrato sobre el que fijarse).



Fig.13

El acuario se encontraba dentro de una cámara en la que se pueden modificar la temperatura y el fotoperíodo. Para controlar cualquier parámetro que pudiera afectar a su supervivencia, se medían diariamente la concentración de oxígeno, el pH y la temperatura del agua, manteniendo el pH entre 7 y 7.5 y el nivel de oxígeno sobre el 90%.

Puesto que *P.vulgata* tiene un ciclo reproductivo de “invierno”, madura con la disminución de la temperatura durante los meses de otoño/invierno. Partiendo de 17°C fuimos disminuyendo la temperatura secuencialmente un grado centígrado por semana hasta llegar a los 13°C, pues una caída por debajo de esta temperatura, provoca el desove en condiciones naturales. Cultivamos las lapas en ausencia de luz las 24 horas.

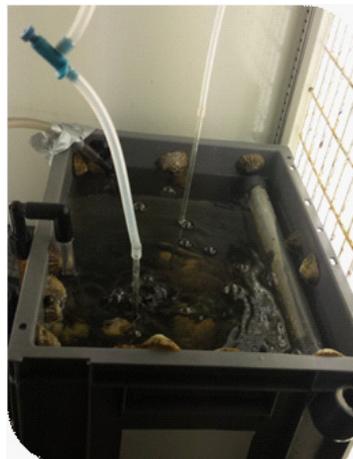


Fig.14

Una vez que conseguimos los 13°C, la gran mayoría de las lapas había sobrevivido (cerca del 90%) y procedimos a extraerlas del cultivo, para determinar el estado de madurez gonadal. El 50% de las lapas supervivientes estaban maduras y aproximadamente el 30% se encontraba en estadios IV y V. Realizamos con ellas una prueba de fecundación *in vitro* utilizando los parámetros estandarizados en las pruebas anteriores, pero los resultados de las pruebas fueron negativos obteniendo porcentajes casi nulos de larvas normales.

Conclusiones: Aunque los resultados de la fecundación *in vitro* con individuos acondicionados en el laboratorio no fueron satisfactorios, sí conseguimos madurar artificialmente las lapas y mantenerlas vivas. En próximos experimentos, puede intentarse el cultivo variando el fotoperiodo para equilibrarlo al fotoperiodo natural de invierno para ver si esto mejora la calidad de los gametos obtenidos y los resultados de la fecundación *in vitro* con organismos de cultivo.

Conclusions: Although the results of the *in vitro* fertilization conducted with conditioned individuals in the laboratory were not satisfactory, we could mature artificially the limpets and keep them alive. In next experiments, the culture can be re-tried setting a photoperiod assimilated to the natural winter photoperiod, to see if this improves the quality of the obtained gametes and the results of the *in vitro* fertilization with cultured organisms.

07

BIBLIOGRAFÍA



- Antonio Solé-Cava, Claudia A.M. Russo, John P. Thorpe (2013). Sperm dimensions of *Patella*. *Marine Genetics*.
- Aquino De Souza R., Tyler P., Hawkins S.J. (2009) Artificial oocyte maturation in *Patella depressa* and *Patella vulgate* using NaOH-alkalinized seawater. *Marine Biology Research* 5: 503-510.
- Fernández, N; Alborés, I; Aceña Matarranz S (2015) Characterization of the reproductive cycle and physiological condition of *Patella vulgata* in the NW of the Iberian Peninsula: Relevant information for a sustainable exploitation. *Fisheries Research* 164: 293 - 301
- Hodgson A. N., Quesne W.J., Hawkins S., Bishop J.D. (2007) Factors affecting fertilization success in two species of patellid limpet (Mollusca: Gastropoda) and development of fertilization kinetics models. *Marine Biology* 150: 415-426.
- Menéndez Valderrey, Juan Luis. "*Patella vulgata*" (Linnaeus, 1758). Asturnatura.com
- Orton J.H., F.R.S., Southward A.J., Dodd J.M. (1956) Studies on the biology of limpets. II. The breeding of *Patella vulgata* L. in Britain. *Journal of the Marine Biological Association of the UK* 35: 149-176.
- Ribeiro, P.A., Xavier, R., Santos, A.M., Hawkins, S.J., (2009) Reproductive cycles of four species of *Patella* (Mollusca: Gastropoda) on the northern and central Portuguese coast. *Journal of the Marine Biological Association of the UK* 89 (6): 1215–1221

