

ONTOGENIA DE LA HUELLA ISÓTOPICA EN LARVAS PREFLEXIÓN DE MERLUZA EUROPEA (*Merluccius merluccius*) CULTIVADAS



Máster Interuniversitario en Biología Marina

Judith Durán Morales

Enero 2016

Director de TFM: Dr. Raúl Laiz Carrión

Centro Oceanográfico de Málaga

Instituto Español de Oceanografía

ÍNDICE

Resumen.....	3
1. Introducción.....	3
1.1. La merluza europea <i>Merluccius merluccius</i> (Linnaeus, 1758): características generales.....	3
1.2. Ecología larvaria de la merluza europea.....	4
1.3. El cultivo de merluza europea.....	5
1.4. Relaciones tróficas: isótopos estables de carbono y nitrógeno y transferencia materna.....	6
2. Objetivos.....	7
3. Materiales y métodos.....	8
3.1. Cultivo y eclosión de larvas de merluza europea.....	8
3.2. Análisis de laboratorio.....	8
3.2.1. Caracterización biométrica de las larvas.....	8
3.2.2. Análisis elemental de carbono y nitrógeno y sus isótopos estables.....	9
3.3. Análisis estadístico.....	10
4. Resultados.....	10
4.1. Crecimiento larvario.....	10
4.2. Variación isotópica.....	11
4.3. Contenido en N y C.....	12
4.4. Factor de discriminación (Δ) de larvas pre-flexión.....	15
5. Discusión.....	17
5.1. Crecimiento larvario.....	18
5.2. Variación isotópica.....	19
5.3. Contenido en carbono y nitrógeno.....	19
5.4. Factor de discriminación (Δ) de larvas pre-flexión.....	20
6. Conclusiones.....	21
7. Agradecimientos.....	22
Bibliografía.....	23

RESUMEN

En este trabajo final de máster se usan isótopos estables de ^{15}N y ^{13}C para conocer el factor de discriminación del desarrollo ontogenético de merluza europea cultivada en laboratorio. Las larvas fueron cultivadas en la Planta Experimental de Cultivos Marinos del Centro Oceanográfico de Vigo (IEO). Se midió la proporción de isótopos estables de N y C en huevos y larvas de hasta 24 días después de la eclosión (larvas preflexión). Se ha visto que el crecimiento en longitud de las larvas es de alrededor de 1 mm en los primeros 24 días de vida, lo que es consecuente con otros experimentos similares; también se ha observado que el $\delta^{15}\text{N}$ disminuye a lo largo del desarrollo larvario y el $\delta^{13}\text{C}$, por el contrario aumenta. La cantidad de carbono y nitrógeno en los tejidos disminuye hasta el día 8, a partir del cual empieza a aumentar, lo que puede deberse a que las larvas comienzan a alimentarse de manera exógena (antes se nutrían del saco vitelino). En cuanto al factor de discriminación Δ para el enriquecimiento en isótopos estables de N y C, sigue una correlación lineal respecto a la talla y a la edad de las larvas; gracias a lo cual hemos creado 4 modelos para estimar la cantidad de isotopo estable que ha sido transmitido por la madre a la larva (huella isotópica de las madres). Los valores de δX_m estimados por los modelos para los huevos de merluza europea son de $\delta^{15}\text{N}=13,369\pm 0,868$ y $\delta^{13}\text{C}=-18,731\pm 0,980$, para la talla y de $\delta^{15}\text{N}=13,370\pm 0,756$ y $\delta^{13}\text{C}=-18,731\pm 0,744$ para la edad, coincidiendo con los valores observados de $\delta^{15}\text{N}=13,370\pm 0,503$ y $\delta^{13}\text{C}=-18,718\pm 0,309$.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 La merluza europea *Merluccius merluccius* (Linnaeus, 1758): características generales.

La merluza europea *Merluccius merluccius* (Linnaeus, 1758) es una especie marina demersal con un rango de profundidad de entre 30-1075 metros (Lloris *et al.*, 2005), pero normalmente vive entre 70-400 metros (Muus y Nielsen, 1999). En la madurez alcanza una longitud de entre 20-70 cm, lo más común es alrededor de 45 cm, un peso máximo reportado de 15 kg (Cohen *et al.*, 1990) y una edad máxima de 20 años (Muus y Nielsen, 1999). Se distribuye por la parte oeste del Atlántico; desde Islandia y Noruega hasta Mauritania. También se encuentra en el Mediterráneo y a lo largo de la costa sur del mar Negro. Los adultos viven cerca del fondo durante el día, pero se separan de él durante la noche. Se alimentan principalmente de pescado (merluzas pequeñas, boquerones, sardinas, arenques, bacalaos) y calamares. Los juveniles se alimentan de crustáceos (eufasiáceos y anfípodos). La puesta es en grupo (Murua y Saborido-Rey, 2003).

La merluza europea es una de las especies demersales más importantes en los ecosistemas marinos del Atlántico Norte. Esta especie está fuertemente explotada por las pesquerías de varios países de Europa, destacando entre ellos España y Francia. La pesquería española

dedicada a la captura de merluza explota dos stocks: el stock Sur, ubicado en la costa cantábrica, Galicia y Portugal y, el stock Norte, que corresponde a aquellas capturas realizadas en zonas localizadas dentro o al norte de la Bahía de Vizcaya. Debido a su sobrepesca, se ha invertido un importante esfuerzo en el intento de cultivarla: engordando adultos previamente pescados (Iglesias *et al.*, 2010; Jolivet *et al.*, 2012), que tras aproximadamente un año de aclimatación tienen puestas espontáneas. Gracias a estas puestas se han podido criar larvas en condiciones de laboratorio (Bustos y Landaeta, 2005; Bjelland y Skiftesvik, 2006; Sánchez *et al.*, 2011). Pero es complicado porque se estresan fácilmente debido al manejo y a las condiciones de pesca inadecuadas.

1.2 Ecología larvaria de la merluza europea.

Los estudios de huevos (Guevara-Fletcher *et al.*, 2016) y larvas de merluza europea son escasos y principalmente analizan distribución en relación con características medioambientales en el Atlántico noreste (Coombs y Mitchell, 1982; Valdés *et al.*, 1996; Motos *et al.*, 2000; Álvarez y Cotano, 2001) y en el Mediterráneo (Olivar *et al.*, 2003).

Los huevos son pelágicos, lisos, esféricos y transparentes y tardan unos 4 días en eclosionar a 12,7°C en laboratorio, en el mar a 10-13°C (Bjelland y Skiftesvik, 2006). Las puestas en el golfo de Vizcaya son más intensas de Marzo a Abril cuando la temperatura del mar oscila entre 10-13°C y están presentes los giros ciclónicos y anticiclónicos (Álvarez *et al.*, 2001); el alimento es lo suficientemente abundante como para no ser un factor limitante en el crecimiento larvario (Álvarez y Cotano, 2005).

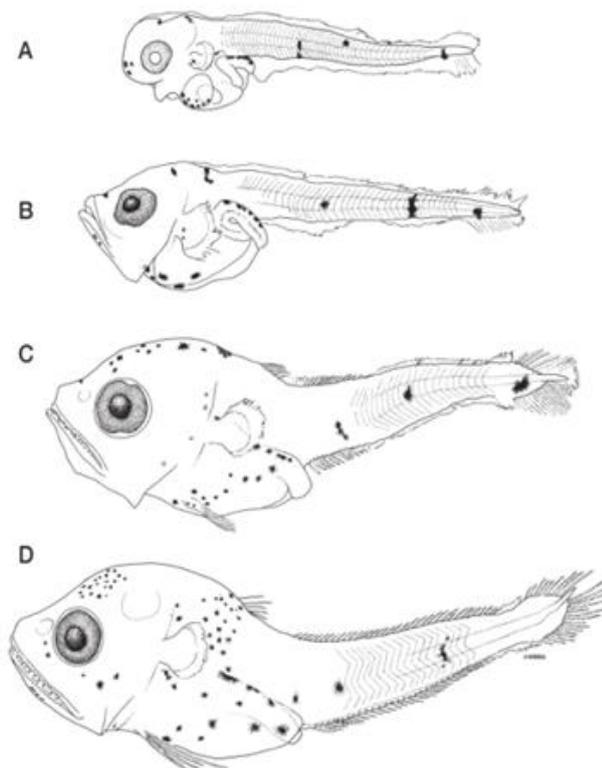


Figura 1. Desarrollo larvario de *Merluccius merluccius*. A) larva recién eclosionada de 2,5 mm, B) larva de 3,8 mm, C) larva de 6,5 mm, D) larva de 9,1 mm. Tomado de Palomera *et al.*, 2005.

Los juveniles se encuentran en aguas profundas (<17 cm) y después van a aguas costeras donde alcanzan una longitud media de 33 cm. La mayoría de los individuos se encuentran en áreas de cría donde se alimentan y crecen y se trasladan a áreas más profundas para realizar la puesta. Se encuentran en cardúmenes, en aguas profundas en invierno y más hacia la costa en verano.

Las larvas y juveniles más pequeños se alimentan de pequeños crustáceos (euphasiáceos, decápodos y misidáceos), y conforme van aumentando de talla los peces van adquiriendo más importancia en su dieta (Cartes *et al.*, 2004).

La supervivencia de las larvas es en función del crecimiento. Según Bjelland (Bjelland, 2001; Bjelland y Skiftesvik, 2006), los cambios en la tasa de crecimiento se pueden definir como: una fase lenta de crecimiento, probablemente asociada a la disminución del saco vitelino y la gota lipídica, su alimentación es endógena y tiene lugar en los días 4-6 post-eclosión (en éstas larvas aun no ha tenido lugar la flexión de la notocorda) y una fase de crecimiento rápido (14-33 días) relacionada con la alimentación exógena (larvas post-flexión).

Se han estimado las tasas de crecimiento de los juveniles de un año y sus variaciones espaciales e interanuales midiendo el crecimiento diario del otolito de muestras recogidas en el golfo de Vizcaya y el mar Céltico, las principales áreas de cría de estas merluzas (Kacher y Amara, 2005) y en el Mediterráneo (Palomera *et al.*, 2005).

1.3 El cultivo de merluza europea.

La merluza europea es una especie comercial muy popular en Europa. En el Atlántico Noreste hay dos stocks: el stock del Sur cuyas áreas de puesta son en el noroeste de la península ibérica y el stock del Norte con puestas en el golfo de Vizcaya (de donde proceden los reproductores de nuestras larvas), el mar Céltico, el mar del Norte, Skagerrak, Kattegat, el oeste de Escocia, y el mar de Irlanda. Es una de las especies demersales mas capturadas en el Atlántico noreste, se han llegado a capturar hasta 175000 toneladas al año (Casey y Pereiro, 1995), pero estas capturas han ido disminuyendo desde 1989 (ICES 2002) con 80000 toneladas en 1995 y 42000 toneladas en 2002, pues debido a su sobrepesca se han tomado medidas para su protección (ICES 2002). Debido a esta sobrepesca y a su alta tasa de crecimiento, las merluzas son interesantes candidatos para el cultivo (Quémener *et al.*, 2002).

Pero hay un gran inconveniente; la merluza europea pone a profundidades de 70-150 m en aguas de 10-13°C y además se estresan fácilmente con la manipulación, por lo que son muy difíciles de mantener vivas después de capturarlas y por ello raramente son mantenidas en cautividad. Pero hay esperanzas pues en Noruega se ha creado un protocolo de cultivo de merluza semiintensivo: fecundaron a los adultos en el barco y después mantuvieron los huevos y larvas en el laboratorio; gracias a lo cual describieron su desarrollo larvario y crecimiento durante los estadios tempranos y la influencia de la temperatura en su desarrollo y supervivencia (Bjelland y Skiftesvik, 2006).

En el instituto oceanográfico de Vigo también han conseguido aclimatar ejemplares adultos de merluza europea capturados en la ría de Vigo (Iglesias *et al.*, 2010). Han logrado que pongan

huevos, la eclosión de estos huevos y que se desarrollen las larvas (Sánchez *et al.*, 2011). Larvas de estas puestas son las que se usan en éste trabajo fin de máster.

Además se han conseguido cultivar en laboratorio ejemplares de otras especies de merluza como la merluza del sur *Merluccius australis* con bastante éxito, esta especie también presenta alta demanda y disminución de capturas (Bustos y Landaeta, 2005).

1.4 Relaciones tróficas: isótopos estables de carbono y nitrógeno y transferencia materna.

Muchos elementos de la Tabla Periódica y entre ellos, el H, C, N, O y S, poseen dos o más isótopos, es decir, átomos del mismo elemento químico que presentan el mismo número atómico (número de protones en el núcleo y de electrones) pero tienen diferente número másico pues el número de neutrones del núcleo es distinto. Estos isótopos pueden ser:

- Radioisótopos o radionúcleos: son radiactivos, se desintegran para dar lugar a otros nucleidos emitiendo partículas o radiación electromagnética.
- Isótopos “estables” que no participan en ningún proceso de desintegración nuclear, de ahí su nombre.

Estos elementos (y sus isótopos) se encuentran ampliamente distribuidos por la litosfera, hidrosfera, biosfera y atmósfera formando las diferentes moléculas, constituyendo unos excelentes trazadores naturales de procesos fisicoquímicos. En los isótopos estables, las diferencias de masa son lo suficientemente grandes como para que las características físicas y químicas de las moléculas que los contienen, sean ligeramente diferentes. En la naturaleza tienen lugar muchos procesos fisicoquímicos (incluyendo las reacciones enzimáticas) que determinan la forma en que los isótopos se reparten entre diferentes sustancias o entre diferentes fases de una misma sustancia, y a esto se le conoce como **fraccionamiento isotópico** (Fry, 2008). Como resultado de estos procesos de fraccionamiento nos encontramos con sustancias que difieren ligeramente en la distribución de isótopos estables y por tanto en su masa, diferencias que pueden medirse mediante la Espectrometría de Masas de Razones Isotópicas (IRMS o GIRMS, en sus siglas inglesas) en lo que denominamos estudios de abundancia natural, por ello son muy utilizados en ecología, para ver las reacciones metabólicas y los flujos de materia en los ecosistemas.

Los más utilizados, son los correspondientes a los elementos ligeros como el hidrógeno, el oxígeno, el carbono, el nitrógeno y el azufre que son precisamente los más abundantes en la naturaleza (Fry, 2008).

De modo general los valores isotópicos de un organismo van a depender de su dieta. Varios estudios (Abend y Smith, 1997; Polunin *et al.*, 2001) infieren que el análisis de isótopos estables es una técnica muy útil para estudiar las relaciones tróficas en las redes alimentarias acuáticas, pues esta puede proporcionar una referencia de la alimentación asimilada por un organismo.

En concreto nosotros vamos a analizar la proporción de los dos isótopos pesados que más se usan para determinar los niveles tróficos $\delta^{15}\text{N}$ y $\delta^{13}\text{C}$ que se acumulan en los tejidos de nuestras larvas de merluza.

Los alimentos ingeridos por los animales a menudo muestran firmas isotópicas características. En general los alimentos obtenidos de fuentes marinas presentan diferente composición isotópica que los derivados de fuentes terrestres y de agua dulce (Chisholm *et al.*, 1982). Las proporciones de los isótopos estables en los tejidos pueden utilizarse para reconstruir las dietas (Angerbjo *et al.*, 1994; Koch *et al.*, 1995), para seguir los movimientos de la especie (Schell *et al.*, 1989), para evaluar la condición fisiológica (Hobson *et al.*, 1993) y para determinar el destino de los nutrientes asimilados dentro del animal (Tieszen y Fagre, 1993). Los isótopos estables también son utilizados para determinar el nivel trófico y la condición corporal del animal. Estas dos últimas aplicaciones son consecuencia del proceso bioquímico de asimilación del alimento, la proteína en los consumidores tiene una mayor relación de $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ que las de su alimento (Ambrose y De Niro, 1986), esta diferencia parece deberse al uso preferencial de los grupos amina con ^{14}N contenido por las enzimas responsables de la desaminación de aminoácidos y transaminación (Macko *et al.*, 1987). Esta diferencia es conocida como enriquecimiento isotópico y se utiliza para calcular la posición trófica de los organismos (Post, 2002) siguiendo la siguiente lógica: si conocemos el $\delta^{15}\text{N}$ del nivel trófico “base” y el $\delta^{15}\text{N}$ de un consumidor, el número de veces que se incrementa el enriquecimiento entre estos dos valores daría una medida de la posición trófica (Hobson y Welch, 1992).

Las diferencias en un ecosistema en los parámetros físico-químicos (temperatura y salinidad), las concentraciones de nutrientes o la composición de especies del sistema, afectan a los valores de $\delta^{15}\text{N}$ y $\delta^{13}\text{C}$ de los productores primarios y por tanto de sus consumidores (Walker *et al.*, 1999).

En nuestro experimento, como vemos la cantidad de isótopos en los huevos además de en las larvas, esto nos permite inferir que el contenido isotópico estimado en los huevos y en larvas con saco vitelino es transmitido maternalmente (Hoffman *et al.*, 2011; Le Bourg *et al.*, 2014) pues la huella isotópica materna es conservada por las larvas en los primeros estadios, por lo que no existen diferencias en la discriminación isotópica entre el tejido somático de la madre y el tejido del saco vitelino (Hoffman *et al.*, 2011; Uriarte *et al.*, 2016).

No hay ningún estudio que haya examinado estos factores de discriminación ni en adultos ni en larvas de *Merluccius merluccius*; por lo tanto éste es el propósito de esta tesis final de máster.

2. OBJETIVOS

- Describir la variación de la huella isotópica a lo largo del desarrollo ontogenético de larvas pre-flexión de merluza europea de cultivo.
- Proponer un modelo de predicción de la huella isotópica de origen materno de las larvas de merluza europea.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Cultivo y eclosión de larvas de merluza europea.

A partir del año 2010 se han realizado múltiples experiencias de cultivo larvario de merluza en España, siendo la Planta Experimental de Cultivos Marinos del Centro Oceanográfico de Vigo (IEO) el equipo de investigación pionero que ha desarrollado esta fase de investigación. Gracias a sus avances para iniciar el cultivo larvario de merluza, se ha podido llevar a cabo el diseño experimental de la presente Tesis Final de Máster. Para detalles ver (Sanchez *et al.* 2011; Jolivet *et al.*, 2012; Iglesias *et al.* 2010).

El 21 de agosto de 2014, y transcurridos 4 días después de la fecundación (dpf), los embriones eclosionaron de acuerdo con Sanchez *et al.*, 2011. Posteriormente, 3 días después de la eclosión, las larvas fueron transferidas a tanques de pvc de 500 L. en una concentración de 20 ind·L⁻¹ con agua de mar ultra-filtrada (0.1 µm) a una temperatura de 16,0 ± 0,5° C y salinidad de 35‰, bajo condiciones naturales de fotoperiodo y un flujo bajo de renovación. Durante el cultivo larvario se utilizaron nauplios de artemia (*Artemia franciscana* AF480) hasta el día 12 después de la eclosión (dph) y a partir de aquí artemia enriquecida (“larva viva Multigane”) como alimentación exógena. Complementariamente se añadieron microalgas *Isochrysis galbana* y *Nanochloropsis* sp. cada día al tanque.

Las muestras de larvas se recogieron en tubos de 1.5 ml con agua de mar y fueron congelados inmediatamente a -80° C. Quince huevos por tubo (y su réplica) fueron muestreados los días 1 y 4 dpf. Seguidamente, se recogieron quince larvas por tubo (y su réplica) cada 2 días hasta el día 12 dph y cada 3 días hasta el día 24 dph (0, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 15, 18, 21 y 24 dph).

3.2 Análisis de laboratorio.

Las larvas obtenidas en el muestreo anteriormente descrito, fueron enviadas en crioviales congelados en hielo seco desde el Instituto Oceanográfico de Vigo al laboratorio de Ecología Larvaria del Centro Oceanográfico de Málaga, donde fueron procesadas. Además para esa puesta tenemos artemia de los días 8, 10, 12, 15, 18, 21 y 24.

Las larvas de los días 0 y 2 post hatching no han podido ser usadas por encontrarse en un estado de conservación deficiente. El resto de muestras fueron procesadas y encapsuladas para el análisis de su contenido en isótopos estables tanto del carbono como del nitrógeno.

3.2.1 Caracterización biométrica de las larvas

Para conocer la talla, se fotografió cada larva con una cámara nikon ajustada al macro de una lupa usando el software libre Q Capture Pro. Se midió la longitud estándar (mm) utilizando un programa de análisis de imagen (Image J) calibrado con los píxel de las imágenes (fotos) obtenidas. Las larvas se preservaron en tubos de plástico tipo eppendorf de 1,5 ml enumerados y ordenados dentro de cajas y conservados a -80°C.

Para determinar el peso seco se liofilizó cada caja durante 24h, posteriormente se pesaron las larvas en una balanza con una precisión de 0,001mg y se congelaron nuevamente a -80°C,

para posteriormente encapsularlas para mandar a analizar sus isótopos estables de carbono y nitrógeno.

3.2.2 Análisis elemental de Carbono y Nitrógeno y sus isótopos estables

Para determinar el contenido total de carbono y nitrógeno, hay que encapsular (en cápsulas de acero inoxidable de 0,03 ml) una muestra (0,1-2 mg) de cada larva previamente liofilizada. Como estas larvas de merluza eran muy pequeñas y pesaban mucho menos de 0,1 mg, hubo que hacer pool con 3, 4, 5 larvas (dependiendo de la talla) para que entrara en el rango lineal de medida del espectrómetro de masas.

La abundancia natural de N ($\delta^{15}\text{N}$, ‰) y C ($\delta^{13}\text{C}$, ‰) fueron medidos usando un analizador elemental EA1108 (Carlo Erba Instruments) unido a un espectrómetro de masas de relaciones isotópicas MAT253 (ThermoFinnigan) de la Unidad de Técnicas Instrumentales de Análisis (UTIA) de la Universidad de La Coruña. Las relaciones isotópicas para $\text{N}^{15}/\text{N}^{14}$ y $\text{C}^{12}/\text{C}^{13}$ se expresaron en notación delta convencional (δ), en relación con la metodología estándar internacional, que usa como estándares $\delta^{15}\text{N}$ (‰) *versus* AIR (N_2 en el aire) y $\delta^{13}\text{C}$ (‰) *versus* VPDB (Pee-Dee Belemnite, fósil marino del Cretácico *Belemnitella americana*), respectivamente. Se utilizó acetanilida como estándar.

Debido a la poca cantidad de muestra, no había posibilidad de una corrección de lípidos a través de una extracción química anterior. Pero se realizó un ajuste posterior de los datos de $\delta^{13}\text{C}$ para el contenido de lípidos, mediante la fórmula empírica resultante de una extracción química de lípidos en larvas de *Merluccius merluccius* y posterior corrección, que dio como resultado esta ecuación: $y = 1,212x + 5,286$. Fue llevada a cabo por la estudiante de doctorado Amaya Uriarte en una estancia en La Coruña. Por lo tanto, para corregir los valores del $\delta^{13}\text{C}$ se ha utilizado un modelo generado con muestras de prejuveniles de esta especie (Ver Uriarte *et al.*, 2013).

El **factor de discriminación (Δ)** de isótopos estables (C y N) es la diferencia en la composición isotópica entre el animal y su fuente de alimento (Caut *et al.*, 2009). Este factor está influenciado por la huella isotópica materna en los estadios larvarios en preflexión, pues la huella isotópica de los huevos es muy similar a la de las larvas recién eclosionadas (Le Bourg *et al.*, 2014). Por lo tanto para estimar el factor de discriminación isotópica debido a la transferencia materna hemos utilizado el modelo propuesto por Uriarte *et al.* 2016 (en revisión) (Uriarte *et al.*, 2014) ($\Delta X_{\text{madre}} = \Delta X_{\text{huevo}}$) para larvas en pre-flexión (1):

$$(1) \Delta X_{\text{madre}} = \delta X_{\text{pre-flexion}} - \delta X_{\text{huevo}}$$

Donde δX representa el fraccionamiento isotópico (C o N) de los huevos de merluza y de las larvas en pre-flexión. El factor de discriminación isotópica de la transferencia materna (ΔX_m) fue estimado por la diferencia entre los valores de fraccionamiento isotópico de los huevos y de las larvas en pre-flexión.

La estima de la huella isotópica de origen materno, fue calculada con las ecuaciones (2 y 3):

$$(2) \delta X_{\text{madre}} = \delta X_{\text{larva}} + (\Delta X_{\text{madre}} * \text{SL}_{\text{larva pre-flexion}})$$

$$(3) \delta X_{\text{madre}} = \delta X_{\text{larva}} + (\Delta X_{\text{madre}} * \text{días}_{\text{pre-flexion}})$$

Donde δX_{madre} representa el fraccionamiento isotópico (C o N) de origen materno a través de la longitud estándar o la edad en días de las larvas en pre-flexión.

El ratio C:N se determinó a partir del porcentaje en peso de cada elemento.

3.3 Análisis Estadístico

Las diferencias entre las distintas variables ($\delta^{15}\text{N}$, $\delta^{13}\text{C}$, %N, %C y C/N) respecto a los distintos días, se sometieron a la prueba de análisis de la varianza (ANOVA de una vía) una vez se verificaron las asunciones de normalidad y homogeneidad de varianzas. En un caso hubo que transformar la variable logarítmicamente ($\delta^{15}\text{N}$) para que cumpliera las asunciones. A continuación se llevaron a cabo análisis post-hoc (test de Tukey) para ver las diferencias entre los distintos grupos (las variables anteriores frente a días post eclosión, que es la variable independiente nominal). En los casos en los que, a pesar de la transformación, no se cumplía la hipótesis de normalidad ($\delta^{13}\text{C}$ y C/N), se llevó a cabo el test no paramétrico de Kruskal-Wallis. El nivel de significación se fijó para todos los análisis en $\alpha = 0,05$. Todas las pruebas estadísticas se realizaron con Statistica 7.0 (Statsoft Inc. EE.UU).

4. RESULTADOS

4.1 Crecimiento larvario.

Hemos analizado un total de 8 pool de huevos y 63 muestras de larvas pre-flexión. Cada muestra de larvas es un pool de 4-5 larvas. Su edad va desde los 4 días después de la eclosión hasta los 24 días (fig.2). En estos días ha habido un incremento en talla de alrededor de 1 mm (~2,9 mm con 4 días hasta ~3,8 mm con 24 días). Presentan una talla media de $3,33 \pm 0,42$ mm, la larva más grande mide 4,41 mm y la más pequeña 2,54 mm.

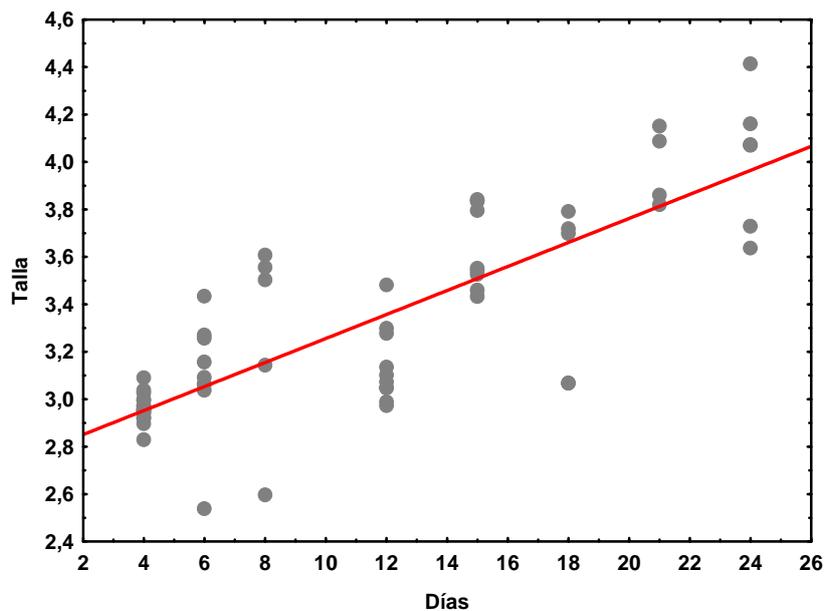


Figura 2. Relación ($p < 0,05$) entre los días después de la eclosión y la talla en larvas de cultivo de merluza europea. $R^2=0,6622$ $y= 2,7497+0,0506*x$.

4.2 Variación isotópica.

La composición isotópica de N y C muestra diferencias durante el desarrollo larvario de la merluza europea cultivada (ANOVA $p < 0,05$ y Kruskal-Wallis $p < 0,05$ respectivamente), desde el huevo (0 días) hasta el día 24 después de la eclosión.

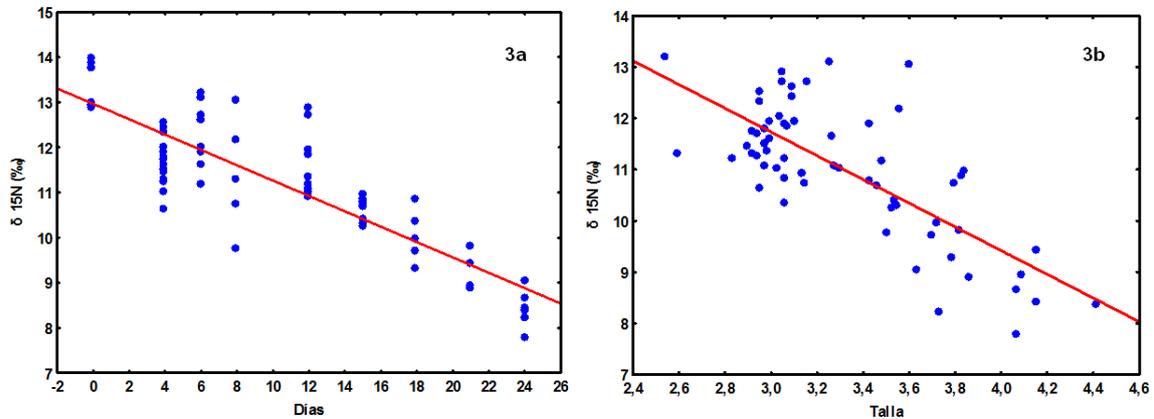


Figura 3. (a) Relación ($p < 0.05$) entre el $\delta^{15}\text{N}$ y los días después de la eclosión $R^2 = 0,7352$ $y = 12,9637 - 0,17 \cdot x$ y (b) el $\delta^{15}\text{N}$ y la talla $R^2 = 0,5570$ $y = 18,6653 - 2,3114 \cdot x$ en larvas de cultivo de merluza europea.

En cuanto al $\delta^{15}\text{N}$, presenta un valor medio de $11,25 \pm 1,45$ ($n = 71$). Los valores de $\delta^{15}\text{N}$ van disminuyendo a lo largo del desarrollo larvario, presentando un máximo de 13,98 en el huevo y un mínimo de 7,78 en larvas de 24 días (fig. 3a). Si comparamos el $\delta^{15}\text{N}$ con la talla de las larvas se aprecia exactamente la misma tendencia, una disminución progresiva del valor desde 13,25 en la larva más pequeña (2,54 mm) hasta los 7,78 que presenta una larva de 4,05 mm (fig. 3b).

Por otro lado, el $\delta^{13}\text{C}$ presenta una tendencia inversa al $\delta^{15}\text{N}$, aumenta conforme las larvas van creciendo en lugar de disminuir. Se han encontrado valores desde -19 (huevos) hasta -14,31 (día 24 después de la eclosión), (fig. 4a). El valor medio es de $-17,75 \pm 1,54$ ($n = 71$).

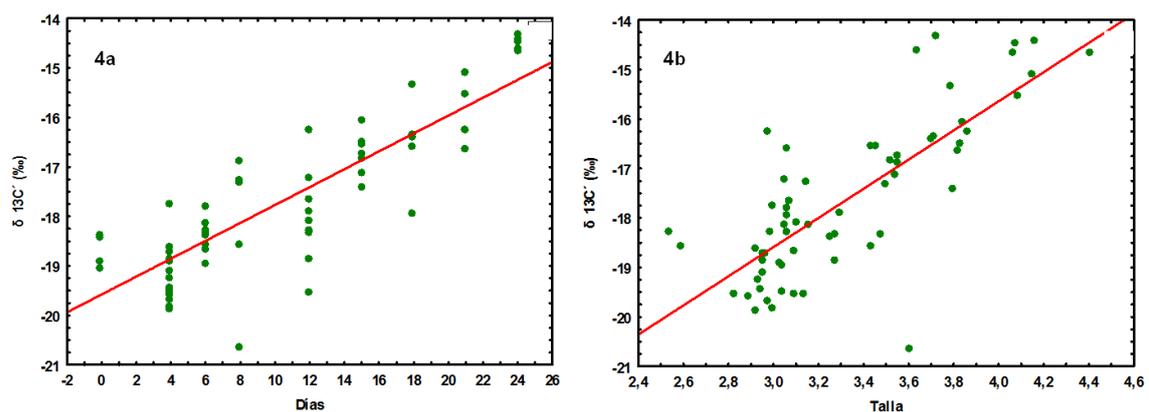


Figura 4. (a) Relación ($p < 0.05$) entre el $\delta^{13}\text{C}$ y los días después de eclosión $R^2 = 0,7353$ $y = 19,5761 + 0,1807 \cdot x$ y (b) el $\delta^{13}\text{C}$ y la talla $R^2 = 0,6053$ $y = -27,4335 + 2,9481 \cdot x$ en larvas de cultivo de merluza europea.

Estos valores han ido aumentando a lo largo del desarrollo larvario, presentando el mínimo (-20,65) el día 8 después de la eclosión (ese día presenta valores muy dispersos en todas las

variables, es un día clave) y un máximo (-14,31) en larvas de 24 días como ya apuntamos antes (fig. 4a). Si comparamos el $\delta^{13}\text{C}$ con la talla, también se aprecia esta tendencia de aumento del valor del $\delta^{13}\text{C}$ conforme las larvas van creciendo: -18,3 en la larva más pequeña (2,54 mm) hasta los -15,1 que presenta la larva más grande (4,41 mm) (fig. 4b).

4.3 Contenido en N y C de las larvas.

El contenido total de N y C también presenta un aumento a lo largo de los primeros estadios de desarrollo de las larvas de merluza europea cultivada (ANOVA $p < 0,05$), a medida que éstas van aumentando la talla. La relación C/N disminuye progresivamente con el aumento de la talla (Kruskal-Wallis $p < 0,05$).

Respecto al %N, se aprecia una tendencia hacia el aumento progresivo en este porcentaje con 1,4% en una de las larvas más pequeñas (2,6 mm) y un máximo de 5,81% en una larva de 4,1 mm (fig. 5). El valor medio es de $2,98 \pm 1,17$ ($n=71$) presentando bastante dispersión.

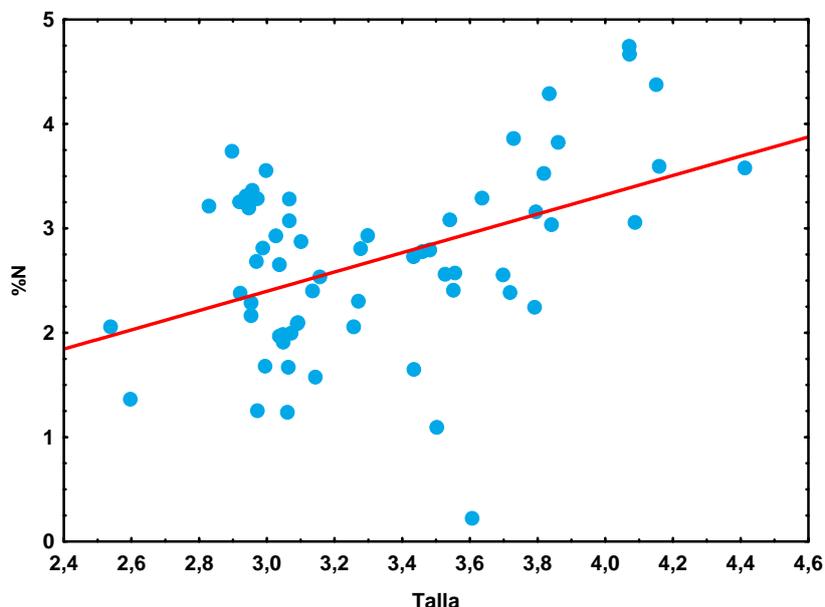


Figura 5. Relación ($p < 0,05$) entre el %N y la talla en larvas de cultivo de merluza europea. $R^2=0,1961$
 $y=-0,3736+0,9238*x$.

En el %C también se aprecia un aumento con 13,5% en la larva más pequeña (2,54 mm) y 18,3% en la larva de más talla 4,41 mm (fig. 6). El valor medio es de $19,96 \pm 7,1$ ($n=71$), hay aún mas dispersión que en el %N y dos valores extremos que aumentan la desviación estándar.

Al contrario que en los dos casos anteriores, a relación C/N presenta una tendencia general a disminuir conforme las larvas van aumentando de tamaño (aumento de la cantidad de nitrógeno respecto a la de carbono en los tejidos de las larvas), a pesar de que hay mucha dispersión (fig. 7). El valor medio es de $6,88 \pm 1,21$ ($n=71$).

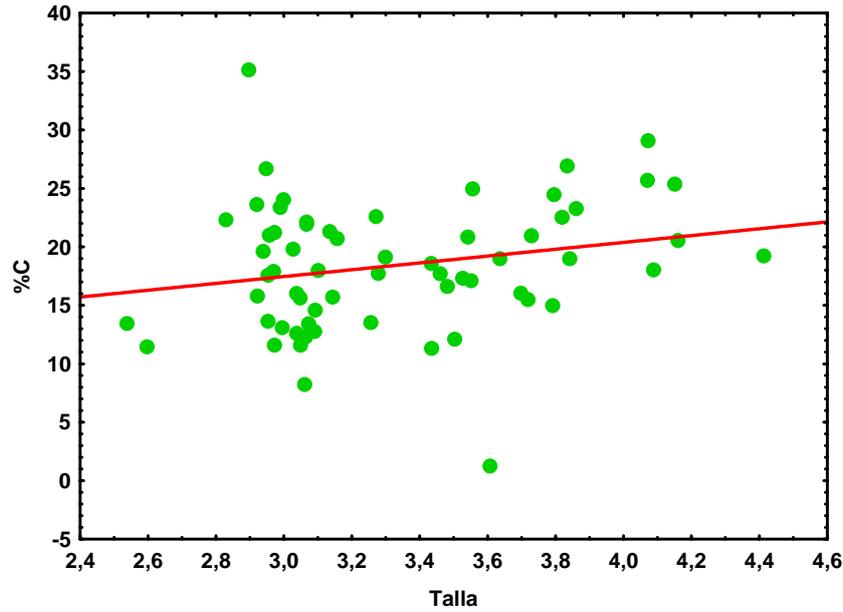


Figura 6. Relación entre el %C y la talla en larvas de cultivo de merluza europea. $R^2=0,0499$
 $y=8,6992+2,9215*x$.

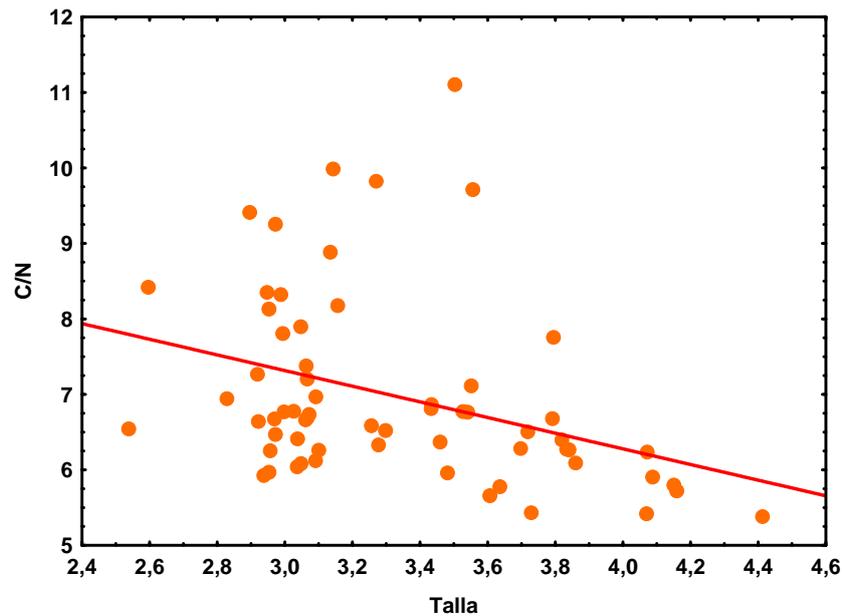


Figura 7. Relación ($p<0.05$) entre la variación C/N y la talla en larvas de cultivo de merluza europea.
 $R^2=0,1249$ $y=10,4268-1,037*x$.

En cuanto a la progresión de la cantidad de N y C en los tejidos de las larvas con el avance del desarrollo, se aprecia claramente una disminución en ambos porcentajes desde la eclosión hasta el día 8, pues las larvas están nutriéndose de las reservas; a partir de éste día aumentan tanto el %N (fig. 8) como el %C (fig. 9) ya que empieza la alimentación exógena.

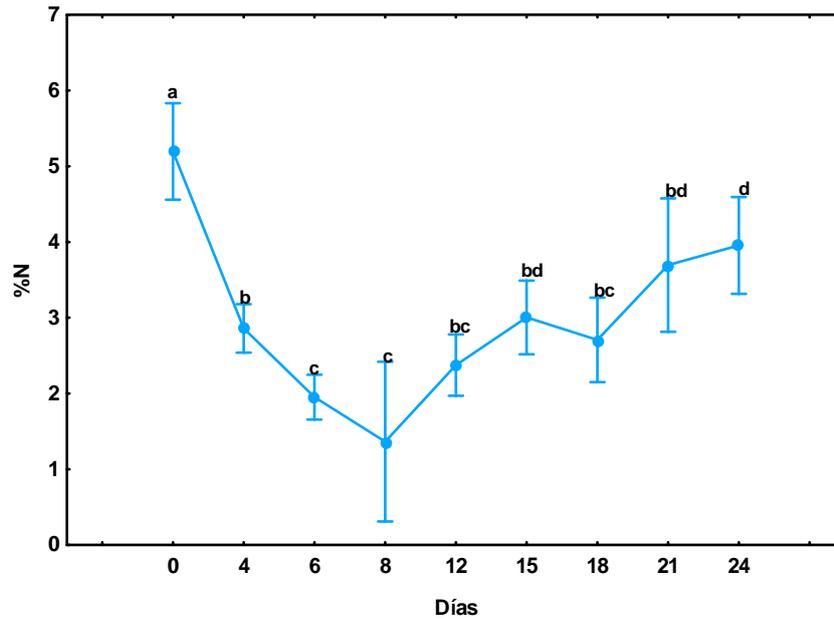


Figura 8. %N en los tejidos de las larvas de merluza europea a lo largo del desarrollo desde el huevo 0 días hasta los 24 días después de la eclosión. Las líneas verticales indican \pm SD (n=71). Las letras indican los diferentes grupos (test de Tukey).

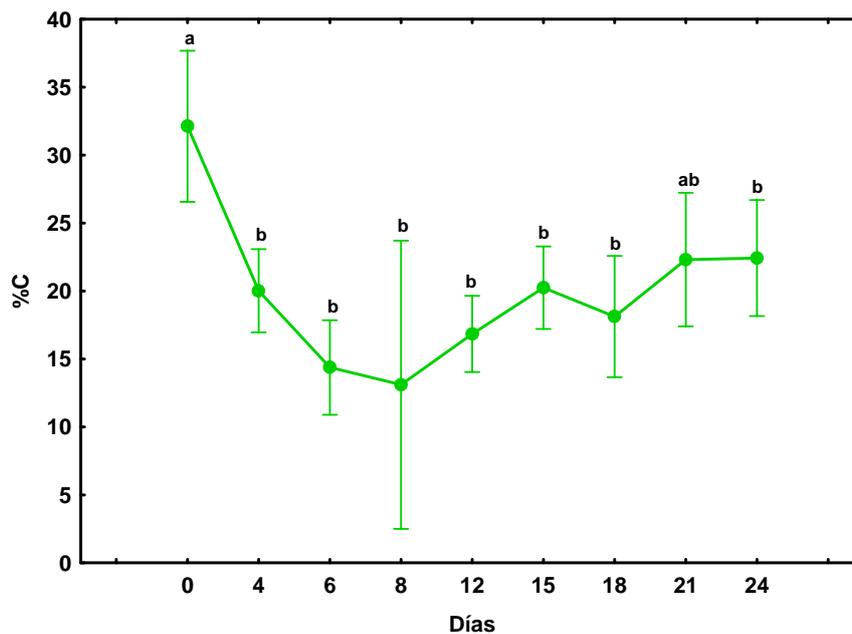


Figura 9. %C en los tejidos de las larvas de merluza europea a lo largo del desarrollo desde el huevo 0 días hasta los 24 días después de la eclosión. Las líneas verticales indican \pm SD (n=71). Las letras indican los diferentes grupos (test de Tukey).

En correspondencia con los datos de %N y %C anteriores, hay en aumento progresivo de la cantidad de C respecto a la de N hasta el día 8 después de la eclosión (fig. 10), y a partir de aquí, aumenta la cantidad de N respecto a la de C pues, como ya hemos mencionado anteriormente, las larvas empiezan a alimentarse de forma exógena por lo que aumenta la

síntesis de proteínas. El día 8 tiene una desviación estándar muy amplia al ser un día clave, en él se aprecia el cambio de la tendencia.

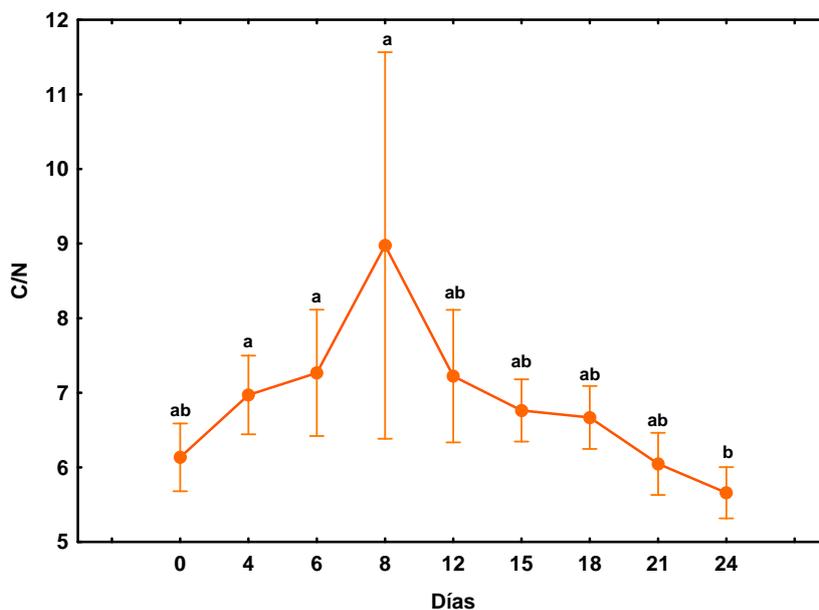


Figura 10. Relación C/N de los tejidos de las larvas de merluza europea a lo largo del desarrollo desde el huevo 0 días hasta los 24 días después de la eclosión. Las líneas verticales indican \pm SD (n=71). Las letras indican los diferentes grupos (test de Kruskal-Wallis).

4.4 Factor de discriminación (Δ) de larvas pre-flexión.

Los valores $\delta^{15}\text{N}$ y $\delta^{13}\text{C}$ de *Merluccius merluccius* son transmitidos maternalmente a la descendencia, pues en los huevos se ha visto la misma composición isotópica que en las madres y su variación sigue un patrón lineal en el tiempo. El $\delta^{15}\text{N}$ empieza con su máximo en los huevos y va disminuyendo progresivamente hasta el día 24; por el contrario, el $\delta^{13}\text{C}$ comienza siendo mínimo en los huevos para aumentar después (fig. 11). Se aprecian diferencias significativas entre los distintos grupos de muestras de cada día (análisis post-hoc, test de Tukey para el $\delta^{15}\text{N}$ y test no paramétrico de Kruskal-Wallis para $\delta^{13}\text{C}$).

El factor de discriminación (Δ) para el enriquecimiento en isótopos estables de N y C originado por la dieta, sigue claramente una correlación lineal respecto a la talla (fig. 12) y también respecto a la edad de las larvas (fig. 13). Gracias a esta relación lineal, se pueden crear dos modelos (con cada isótopo, N y C) para estimar la cantidad de isótopo estable que ha sido transmitido por la madre a la larva; para ello hay que tener en cuenta la talla de las larvas para uno de los modelos, (fig. 12) y la edad de las larvas para el otro modelo, (fig. 13). La composición isotópica estimada de origen materno no difiere significativamente de la huella isotópica encontrada en los huevos (Kruskal-Wallis, $p>0.05$) (Tabla 1). Por lo tanto, usando éstos 4 modelos propuestos en la tabla 1, se pueden predecir las huellas isotópicas transmitidas por sus madres a las larvas de merluza europea en estado pre-flexión.

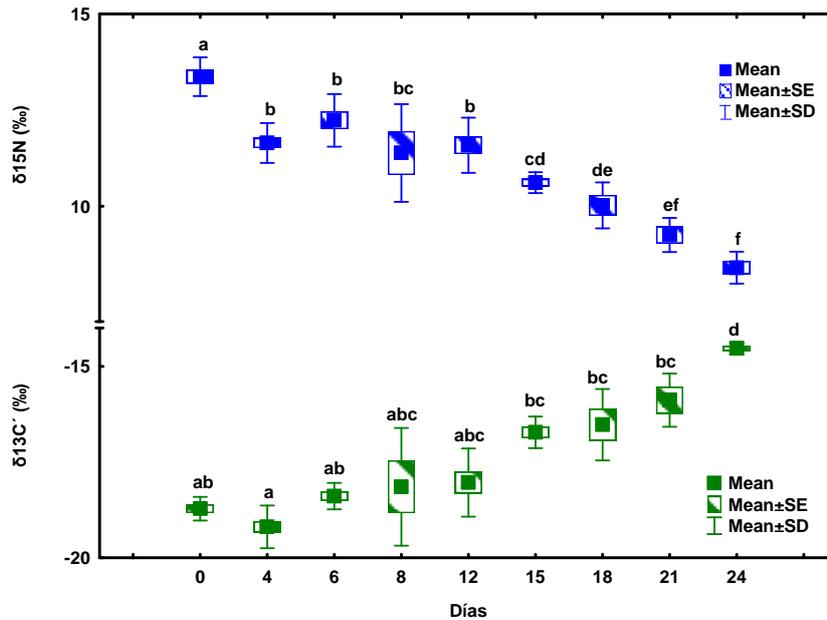


Figura 11. Boxplot del $\delta^{15}\text{N}$ y $\delta^{13}\text{C}$ a lo largo del desarrollo de larvas de merluza europea desde el huevo 0 días hasta los 24 días después de la eclosión ($n=71$). Los símbolos azules corresponden al $\delta^{15}\text{N}$ y los verdes al $\delta^{13}\text{C}$. Las letras indican los diferentes grupos (test de Tukey para el $\delta^{15}\text{N}$ y test de Kruskal-Wallis para el $\delta^{13}\text{C}$).

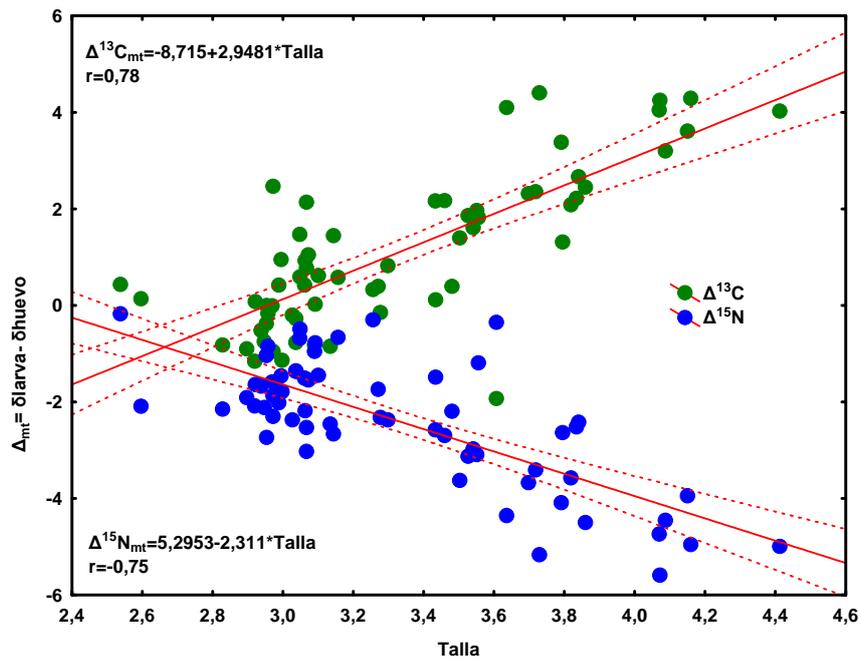


Figura 12. Correlación de los factores de discriminación frente a la talla (mm) en larvas de merluza europea desde el huevo 0 días hasta los 24 días después de la eclosión. Las líneas discontinuas rojas son las bandas de regresión con un intervalo de confianza del 0,95%.

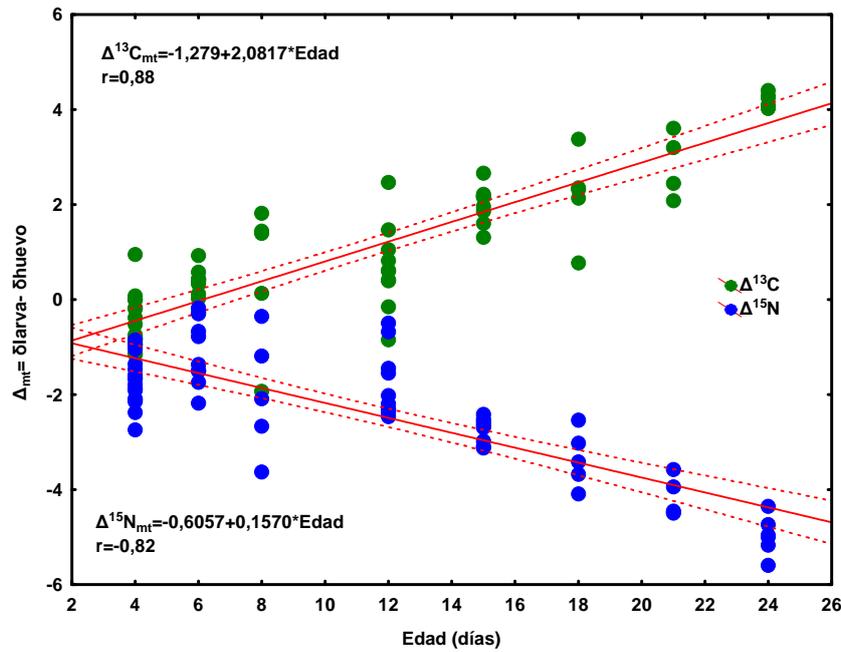


Figura 13. Correlación de los factores de discriminación frente a la edad (días después de la eclosión) en larvas de merluza europea desde el huevo. Las líneas discontinuas rojas son las bandas de regresión con un intervalo de confianza del 0,95%.

Modelo para predecir la δX_m transmitida maternamente usando la talla (mm) y la edad (n=63)	r	δX_m Observada en los huevos (n=8)	δX_m Estimada (n=63)
$\delta^{15}\text{N} (\text{‰}) = \delta^{15}\text{N}_{\text{larva}} + (5,2953 - 2,311 * \text{Talla}_{(\text{mm})})$	-0,75	13,370 ± 0,503	13,369 ± 0,868
$\delta^{13}\text{C} (\text{‰}) = \delta^{13}\text{C}_{\text{larva}} + (-8,715 + 2,9481 * \text{Talla}_{(\text{mm})})$	0,78	-18,718 ± 0,309	-18,731 ± 0,980
$\delta^{15}\text{N} (\text{‰}) = \delta^{15}\text{N}_{\text{larva}} + (-0,6057 + 0,1570 * \text{Edad})$	-0,82	13,370 ± 0,503	13,370 ± 0,756
$\delta^{13}\text{C} (\text{‰}) = \delta^{13}\text{C}_{\text{larva}} + (-1,279 + 2,0817 * \text{Edad})$	0,88	-18,718 ± 0,309	-18,731 ± 0,744

Tabla 1. Modelo para predecir la huella isotópica ($\delta^{15}\text{N}$ y $\delta^{13}\text{C}$) transmitida maternamente δX_m , en larvas pre-flexión de merluza europea usando la talla (mm) y edad (días).

5. DISCUSIÓN

Los estudios de isótopos estables están muy extendidos para evaluar los trazadores bioquímicos de los flujos tróficos que tienen lugar entre los distintos niveles de las redes alimentarias en los ecosistemas (Post, 2002; Pepin y Dower, 2007; Bode *et al.*, 2007). Sin embargo estos isótopos son poco usados para la comprensión de los procesos fisiológicos relacionados con el desarrollo larvario de especies de interés comercial y la interpretación de las estimas de estos isótopos en éstas larvas, como por ejemplo las de atún (Laiz-Carrión *et al.*, 2014; 2015). Menos estudios aún se han hecho en larvas en condiciones experimentales (Gamboa *et al.*, 2008; Tanaka *et al.*, 2012; Uriarte *et al.*, 2013; 2016). El de Uriarte *et al.*, 2016 es en larvas de atún y es en el que se basa este trabajo. Por lo tanto, el objetivo de ésta memoria es analizar la evolución de la huella isotópica de N y C de merluza europea

(*Merluccius merluccius* L.) de cultivo, a lo largo de la etapa pre-flexión de su desarrollo ontogenético y la creación de un modelo para predecir la huella materna a partir de la de las larvas.

5.1 Crecimiento larvario.

Desde el punto de vista ecológico, el crecimiento larvario es primordial para su supervivencia (Anderson, 1988). Para las especies comerciales, la supervivencia de las larvas está directamente relacionada con el reclutamiento y también con la variación de los procesos físicos oceanográficos (Jeffrey y Taggart, 2000) o con la depredación de las larvas o juveniles por otras especies o por canibalismo (Grote *et al.*, 2012), lo que tiene importantes implicaciones en la gestión de las pesquerías. Se ha observado en estudios de ecología trófica de larvas de peces que hay un “periodo crítico” en la transición de la fase de saco vitelino a alimentación exógena, que es vital para la supervivencia de las larvas (Fortier y Leggett, 1985).

En cuanto a las larvas de cultivo, los distintos tipos de dietas o de presas tienen consecuencias en el crecimiento (Tanaka *et al.*, 2010; 2012). Debido a que las condiciones experimentales en las que se ha llevado a cabo el presente cultivo larvario difieren de manera importante de las condiciones naturales, el crecimiento larvario observado en este experimento es notablemente inferior al referenciado en la literatura para larvas de merluza en condiciones salvajes (ver Alvarez y Cotano 2005). Sin embargo el crecimiento observado en el presente diseño experimental es similar al observado previamente para larvas cultivadas (Palomera *et al.*, 2005; Bjelland *et al.*, 2006; Sánchez *et al.*, 2011).

En el desarrollo larvario de merluzas europeas se ha visto que: el cuerpo crece en talla más lentamente que algunas porciones corporales como el pedúnculo caudal que presenta gran desarrollo (relacionado con actividad locomotora); también crecen más rápido la cabeza y regiones del intestino (relacionado con el régimen alimenticio) (Palomera *et al.*, 2005). Esto es consecuente con nuestros datos ya que nuestras larvas crecen en talla alrededor de 1mm en sus primeros 24 días de vida (fig. 2). El desarrollo ontogenético de estas especies con un crecimiento alométrico positivo en la parte anterior del cuerpo en relación con la longitud estándar, indica que las larvas tienen mayor crecimiento en grosor que en longitud (Palomera *et al.*, 2005); estos datos son de larvas en el campo. Nuestros datos de peso de las larvas (no mostrados) nos revelan que tampoco existe una ganancia importante en peso, lo que podría ser debido a una alimentación deficitaria en relación a sus requerimientos energéticos, pues el cultivo larvario de esta especie se encuentra actualmente en una fase de optimización de sus condiciones, en especial su alimentación, donde se están focalizando los recursos de investigación en acuicultura de diferentes organismos e instituciones a nivel internacional. Nuestros datos de tallas en los primeros 24 días de las larvas coinciden con otros datos experimentales de larvas de cultivo (Bjelland y Skiftesvik, 2006; Sánchez *et al.*, 2011); en los que se ha visto que: recién eclosionadas las larvas miden 2.89 ± 0.15 mm, en los primeros 4 días aumentan en longitud en más de 1mm, pero de los días 4-11 no hay crecimiento en longitud y peso significativo, pues lo que crece principalmente es la cabeza y el día 25 las larvas miden 4,5mm.

5.2 Variación isotópica.

Es la primera vez que se analizan isótopos estables en larvas de merluza por lo tanto no hay un referente para comparar nuestros datos. Sin embargo, estudios que se están llevando a cabo en larvas capturadas en aguas gallegas por el grupo de Ecología Larvaria del Centro Oceanográfico de Málaga, revelan valores de $\delta^{15}\text{N}$ decrecientes junto con valores crecientes de $\delta^{13}\text{C}$ con la ontogenia (talla) (Laiz-Carrión *et al.*, 2013), sugiriendo un efecto de transferencia, tal y como los demuestran los resultados obtenidos en la presente Tesis de Máster (ver figuras 12 y 13).

En cuanto al valor del $\delta^{15}\text{N}$, hay un enriquecimiento en el isótopo pesado conforme se asciende en las redes tróficas marinas (cerca del 3‰ de incremento por nivel trófico) (Minagawa y Wada, 1984). Esto está relacionado con la mayor energía asociada a los enlaces que establece el isótopo pesado, que hacen que intervenga menos en las reacciones químicas; por ello se acumula más el pesado y se excreta el ligero (Fry, 2008). Debido a esto hay un máximo de $\delta^{15}\text{N}$ de 13,98 en nuestros huevos, pues esa huella isotópica procede de la de la madre durante la ovogénesis (Uriarte *et al.*, 2016). A lo largo de los días de desarrollo va disminuyendo hasta 7,78 en larvas de 24 días (fig. 3), esto puede ser debido a que la larva hasta el día 8 no empieza su alimentación exógena (antes se alimentaba del saco vitelino y de la gota lipídica) (Bjelland y Skiftesvik, 2006) y a partir de este día, su alimentación es deficitaria, por lo que la incorporación de N exógeno es muy limitada y disminuye su discriminación, llegando a excretar los isótopos pesado y ligero por igual. Esto, unido a que la huella isotópica de partida (en el huevo) es elevada, al ser similar a la de la hembra madura (predador apical), hace que los valores de $\delta^{15}\text{N}$ disminuyan a lo largo del desarrollo ontogenético hasta que la larva alcance un equilibrio con su dieta y los valores tiendan a estabilizarse.

Con el valor del $\delta^{13}\text{C}$ ocurre lo inverso al $\delta^{15}\text{N}$; aumenta conforme las larvas van creciendo en lugar de disminuir. El C procede linealmente del que ingieren los consumidores primarios que se alimentan del fitoplancton; este fitoplancton incorpora preferentemente C^{12} en la fotosíntesis por ello los valores de $\delta^{13}\text{C}$ son muy negativos (Fry, 2008). Este $\delta^{13}\text{C}$ va aumentando con la edad de las larvas (fig. 4) porque se van alimentando de la gota lipídica y se va gastando proporcionalmente el C^{12} (ligero). Cuando empiecen a alimentarse correctamente de forma exógena y comience la flexión (a partir del día 24) el $\delta^{13}\text{C}$ volverá a disminuir de igual manera que el $\delta^{15}\text{N}$ aumentará de nuevo si ocurre lo mismo que con el atún (Uriarte *et al.*, 2016).

5.3 Contenido en carbono y nitrógeno.

En cuanto al contenido total en C y N de las larvas, se aprecia un aumento general al aumentar la talla lo que es habitual en larvas de peces con rápidos cambios morfológicos junto con procesos de almacenamiento de energía (Coombs *et al.*, 1999).

Primero se aprecia una clara disminución de ambos porcentajes desde la eclosión hasta el día 8 (figs. 8 y 9), esto es debido a que las larvas están nutriéndose de las reservas (del saco

vitelino y de la gota lipídica); el carbono cae mas bruscamente porque se gasta el vitelo permaneciendo aún parte de la gota lipídica (Coombs y Mitchell, 1982; Marrale *et al.*, 1996; Bjelland y Skiftesvik, 2006).

A partir de éste **día 8** aumentan tanto el %N como el %C ya que empieza la alimentación exógena pues alrededor del día 6 tuvo lugar la apertura de la boca y el día 7-8 empiezan a comer (Bjelland y Skiftesvik, 2006; Sánchez *et al.*, 2011). La gota lipídica desaparece completamente el día 11; hasta este día no empiezan a crecer las larvas en talla y peso (Bjelland y Skiftesvik, 2006).

En correspondencia con éstos datos, hay en aumento progresivo de la **relación C/N** hasta el día 8 (fig. 10), y a partir de aquí, aumenta la cantidad de N respecto a la de C pues, como ya hemos mencionado anteriormente, las larvas empiezan a alimentarse de forma exógena por lo que aumenta la síntesis de proteínas (crecimiento somático).

El **día 8 después de la eclosión** presenta mucha dispersión de los datos pues es el **día clave o de transición** en el que unas larvas tienen la boca abierta y comienzan a comer, y en cambio otras la tienen abierta pero aun no han establecido alimentación exógena con éxito.

5.4 Factor de discriminación (Δ) de larvas pre-flexión.

En los primeros estadios larvarios hay una mortalidad alta porque el gasto de comida no compensa completamente las tasas de crecimiento somáticas lo que lleva a una caída de los radios isotópicos (Uriarte *et al.*, 2016). El papel de la influencia materna es capital para que la descendencia esté sana, pues el estado de los huevos depende de la nutrición de la madre (Pérez y Fuiman, 2015). Se ha comprobado en diversos estudios que el contenido isotópico de los huevos y de la larvas lecitotróficas es transmitido maternalmente, lo que implica que no hay prácticamente diferencias entre el tejido somático materno y el saco vitelino (Hoffman *et al.*, 2011; Le Bourg *et al.*, 2014). Por ello una madre sana tendrá descendencia sana, pues como ya sabemos el ambiente materno tiene un gran efecto en el fenotipo de la descendencia (Grindstaff *et al.*, 2003).

Los valores δX_m de nuestros huevos de merluza europea son de $\delta^{15}N=13,370\pm 0,503$ y $\delta^{13}C=-18,718\pm 0,309$ muy parecidos a los de los huevos de atún rojo de acuicultura (Uriarte *et al.*, 2016): $\delta^{15}N=12,30\pm 0,04$ y $\delta^{13}C=-17,80\pm 0,03$. En la presente memoria de tesis final de Máster, se proponen **cuatro modelos** (ver tabla 1) a través de los que se puede estimar la huella isotópica de las madres que, como hemos comprobado, es prácticamente la misma que la observada en los huevos, a partir de una talla o edad conocida de la larva, validando los modelos propuestos.

Esto es muy útil pues conociendo la huella isotópica materna se pueden estimar las condiciones tróficas de la madre lo que está directamente relacionado con el crecimiento y condición de las larvas.

6. CONCLUSIONES

- Las larvas de merluza europea cultivadas presentan un **crecimiento** lento en longitud en sus primeros 24 días de vida, alrededor de 1 mm. Pero esto es consecuente con otros trabajos, pues en lugar de crecer en longitud aumenta el tamaño de la cabeza y crecen en grosor.
- Los **valores de $\delta^{15}\text{N}$** disminuyen a lo largo del desarrollo larvario, en gran medida debido a que la huella isotópica del huevo es elevada, por la transferencia materna, junto con una elevada síntesis proteica en estos estadios de desarrollo, lo que produce una reducción de la discriminación isotópica con el tiempo.
- Por el contrario los **valores de $\delta^{13}\text{C}$** aumentan a lo largo del desarrollo ontogenético, debido a la baja huella isotópica del huevo, por transferencia materna, junto con un elevado metabolismo de lípidos provocado por la absorción de la gota lipídica.
- La **cantidad de carbono y nitrógeno** en los tejidos disminuye hasta el día 8 pues las larvas se nutren del propio saco vitelino y de la gota lipídica. A partir de aquí empieza a aumentar, debido a la alimentación exógena y aumentando la proporción de N respecto de la de C reflejo de un aumento en la síntesis de aminoácidos estructurales.
- Se postulan **4 modelos** para estimar la cantidad de isótopo estable (carbono y nitrógeno) que ha sido transmitido por la madre a la larva (huella isotópica de las madres) en función de la talla y/o la edad de la larva, debido a que el factor de discriminación Δ para el enriquecimiento en isótopos estables de N y C sigue una correlación lineal respecto a la talla y a la edad de las larvas. Los valores estimados coinciden con los valores observados, validando dichos modelos.

7. AGRADECIMIENTOS

En primer lugar quiero dar las gracias al director de este trabajo fin de máster, el Dr. Raúl Laiz Carrión, por haberme acogido tanto para las prácticas como para el TFM, por enseñarme todo lo que sé sobre larvas de peces, por responder a todas mis preguntas y atenderme siempre con una sonrisa y ayudarme a escribir esta tesis.

También quiero darle las gracias al equipo del laboratorio de Ictioplancton del Centro Oceanográfico de Málaga: a Amaya Uriarte por guiarme en el trabajo de laboratorio y ayudarme con el Statistica, sin ella no lo habría logrado. Al Dr. Alberto García por sus sabios consejos y su gran experiencia y a José María Quintanilla por resolverme dudas cuando ha sido necesario.

A Javier Rey, también del Oceanográfico de Málaga, por ayudarme a aclarar ideas.

Por último quiero agradecer a la Dr. Montse Pérez y Manuel Nande de la Planta Experimental de Cultivos Marinos del Centro Oceanográfico de Vigo por habernos enviado las larvas y por ayudarnos a completar este trabajo; y a las técnicas de la planta de cultivo Castora Gómez y María Jesús Lago.

La presente Tesis Final de Máster ha sido llevada a cabo gracias a los proyectos de investigación: CRAMER-CTM2010-21856-CO3-02 financiado por el MICIN; ECOPREGA-10MMA602021PR financiado por la Xunta de Galicia y LETSHAKE (AGL2013-48468-R) del Ministerio de Economía y Competitividad cofinanciado con fondos FEDER.

Granada, a 26 de Enero de 2016.

Firmado:



Judith Durán Morales

BIBLIOGRAFÍA

- Abend, A.G. y Smith, T. "Differences in stable ratios of carbon and nitrogen between long-finned pilot whales (*Globicephala melas*) and their primary prey in the western north Atlantic." *ICES Jou Mar Sci*, 1997: 54, 500-503.
- Alvarez, P. y Cotano, U. "Growth, mortality and hatch-date distributions of European hake larvae, *Merluccius merluccius* (L.), in the Bay of Biscay." *Fisheries Research*, 2005: 379-391.
- Alvarez, P., Motos, L., Uriarte, A. y Egaña, J. "Spatial and temporal distribution of European hake, *Merluccius merluccius* (L.), eggs and larvae in relation to hydrographical conditions in the Bay of Biscay." *Fisheries Research Vol.50*, 2001: 111-128.
- Ambrose, S.H. y De Niro, M.J. "The isotopic ecology of East African mammals." *Oecologia*, 1986: 69, 395-406.
- Anderson, J.T. "A review of size dependent survival during prerecruit stages of fishes in relation to recruitment." *J. Northw. Atl. Fish. Sci.*, 1988: 8, 55-66.
- Angerbjo, A., Hersteinsson, P., Klidén, K. y Nelson, E. "Dietary variation in Arctic foxes (*Alopex lagopus*): an analysis of stable carbon isotopes." *Oecologia*, 1994: 99, 226-232.
- Bjelland, R.M. y Skiftesvik, A.B. "Larval development in European hake (*Merluccius merluccius* L.) reared in a semi-intensive culture system." *Aquaculture Research*, 2006: 1117-1129.
- Bjelland, R.M. "European hake, *Merluccius merluccius* (L. 1758), a new candidate for aquaculture? Rearing techniques, larval development and startfeeding." *Ms.thesis. Dept. Fisheries and Marine Biology, University of Bergen, Norway*, 2001.
- Bode, A., Álvarez-Ossorio, M.T., Cunha, M.E., Garrido, S., Peleteiro, J.B., Porteiro C., Valdés, L. y Varela, M. "Stable nitrogen isotope studies of the pelagic food web on the Atlantic shelf of the Iberian Peninsula." *Prog. Oceanogr.*, 2007: 74, 115-131.
- Bustos, C.A. y Landaeta, M.F. "Development of eggs and early larvae of the southern hake *Merluccius australis*, reared under laboratory conditions." *Gayana*, 2005: 402-408.
- Cartes, J.E., Rey, J., Lloris, D. y Gil de Sola, L. "Influence of environmental variables on the feeding and diet of European hake (*Merluccius merluccius*) on the Mediterranean Iberian coasts." *J. Mar. Biol. Ass. U.K.*, 2004: 84(4):831-835.
- Casey, J. y Pereiro, J. "European hake (*M. merluccius*) in the North-east Atlantic." In *Hake: Biology, Fisheries and Markets* (ed. by), pp.125-147. Chapman, by J. Alheit & T.J. Pitcher, 125-147. London UK: Chapman and Hall, 1995.

Caut, S., Angulo, E. y Courchamp, F. "Variation in discrimination factors ($\Delta^{15}\text{N}$ and $\Delta^{13}\text{C}$): the effect of diet isotopic values and applications for diet reconstruction." *J. Appl. Ecol.*, 2009: 46, 443-453.

Chisholm, B.S., Nelson, D.E. y Schwarcz, H.P. "Stable-carbon isotope ratios as a measure of marine versus terrestrial protein in ancient diets." *Science*, 1982: 216, 1131–1132.

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

Coombs, S.H. y Mitchell, C.E. "The development rate of eggs and larvae of the hake *Merluccius merluccius* (L.) and their distribution to the west of the British Isles." *J. Cons. int. Explor. Mer.*, 1982: 119-126.

Coombs, S.H., Conway, D.V.P., Morley, S.A. y Halliday, N.C. "Carbon content and nutritional condition of sardine larvae (*Sardina pilchardus*) off the Atlantic coast of Spain." *Mar Bio.*, 1999: 134, 367-373.

Fortier, L. y Leggett, W. "A drift study of larval fish survival." *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 1985: 25, 245-257.

Fry, Brian. *Stable Isotope Ecology*. USA: Springer, 2008.

Gamboa-Delgado, J., Cañavate, J.P., Zerolo, R. y Le Vay, L. "Natural carbon stable isotope ratios as indicators of the relative contribution of live and inert diets to growth in larval Senegalese sole (*Solea senegalensis*)." *Aquaculture*, 2008: 280, 190-197.

Guevara-Fletcher, C., Álvarez, P., Sánchez, J. e Iglesias, J. "Effect of temperature on the development and mortality of European hake (*Merluccius merluccius* L.) eggs from southern stock under laboratory conditions". *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 2016: 476, 50-57.

Grindstaff, J.L., Brodie, III E.D. y Ketterson E.D. "Immune function across generations: integrating mechanism and evolutionary process in maternal antibody transmission." *Proc. Roy. Soci., London.*, 2003: 270, 2309-19.

Grote, B., Ekau, W., Stenevik, E.K., Clemmesen, C., Verheye, H.M., Lipinski, M.R. y Hagen, W. "Characteristics of survivors: growth and nutritional condition of early stages of the hake species *Merluccius paradoxus* and *M. capensis* in the southern Benguela ecosystem." *ICES Journal of Marine Science*, 2012: 69(4), 553–562.

Hobson, K.A. y Welch, H.E. "Determination of trophic relationships within a high Arctic marine food web using $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$ analysis." *Mar Eco Pro Ser*, 1992: 84, 9-18.

Hobson, K.A., Alisauskas, R.T. y Clark, R.G. "Stable-nitrogen isotope enrichment in avian tissues due to fasting and nutritional stress: implications for isotopic analysis of diet." *Condor*, 1993: 95, 388–394.

Hoffman, J.C., Cotter, A.M., Peterson, G.S., Corry, T.D. y Kelly, J.R. "Rapid stable isotope turnover of larval fish in a Lake Superior coastal wetland: Implications for diet and life history studies." *Aquat. Ecosys. Health. Manage*, 2011: 14.4, 403-413.

ICES. "Hake-Northern stock (Division IIIa, Sub-areas IV, Vland VII and Divisions VIIIa,b)." *ICES*, 2002: 555-564.

Iglesias, J., Lago, M.J., Sánchez, F.J. y Cal, R. "Capture, transport and acclimatization to captivity of European hake, *Merluccius merluccius* L: preliminary data on feeding and growth." *Aquaculture Research*, 2010: 607-609.

Jeffrey, J.A. y Taggart, C.T. "Growth variation and water mass associations of larval silver hake (*Merluccius bilinearis*) on the Scotian Shelf." *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, 2000: 57: 1728-1738.

Jolivet, A., de Pontual, H., Hervy, M., Paulet, Y.M. y Fablet R. "Preliminary observations of survival and growth of European hake in captivity." *Aquaculture Research*, 2012: 949-954.

Kacher, M. y Amara, R. "Distribution and growth of 0-group European hake in the Bay of Biscay and Celtic Sea: a spatial and inter-annual analyses." *Fisheries Research*, 2005: 373-378.

Koch, P.L., Heisinger, J., Moss, C., Carlson, R.W., Fogel, M.L. y Behrensmeyer, A.K. "Isotopic tracking of change in diet and habitat use of African elephants ." *Science*, 1995: 267, 1340–1343.

Laiz-Carrión R., G. T., Uriarte A., Malca E., Quintanilla J.M., Muhling B., Alemany F., Privoznik S., Shiroza A., Lamkin J. y García, A. "Larval bluefin tuna (*Thunnus thynnus*) trophodynamics from Balearic sea (WM) and Gulf of Mexico spawning ecosystems by stable isotope." *ICCAT*, 2014.

Laiz-Carrión R., Uriarte A., Quintanilla J.M., Cabrero A., Hernandez de Rojas A., Rodriguez-Fernandez L., Rodriguez J.M., Gago J., Pinheiro C., Bode A. y Garcia A. "Early life trophic ecology of European hake *Merluccius merluccius* by stable isotopes analysis." *37th Fish Larval Conference*. Miami (EEUU), 2013.

Laiz-Carrión, R., Gerard, T., Uriarte, A., Malca, E., Quintanilla, J.M., Muhling, B., Alemany, F., Privoznik, S., Shiroza, A., Lamkin, J. y García, A. "Trophic Ecology of Atlantic Bluefin Tuna (*Thunnus thynnus*) Larvae from the Gulf of Mexico and NW Mediterranean Spawning Grounds: A Comparative Stable Isotope Study." *PLoS ONE* 10, 7. e0138638. doi:10.1371/journal.pone.0138638., 2015.

Le Bourg, B., Bustamante, J. y Kiszka, P. "Mother–embryo isotope ($\delta^{15}\text{N}$, $\delta^{13}\text{C}$) fractionation and fractionation and mercury (Hg) transfer in aplacental deep-sea sharks." *J. Fish. Biol.*, 2014: 84. 5, 1574-1581.

Lloris, D., Matallanas, J. y Oliver, P. *Hakes of the world (Family Merlucciidae). An annotated and illustrated catalogue of hake species known to date*. Rome: FAO Species Catalogue for Fishery Purposes, 2005.

Macko, S.A., Fogel-Estep, M.L., Engel, M.H. y Hare, P.E. "Isotopic fractionation of nitrogen and carbon in the synthesis of amino acids by microorganisms." *Chem Geol*, 1987: 65, 79–92.

Marrale, D. Álvarez, P. y Motos, L. "Development and identification of European hake *Merluccius merluccius* L. embrionic and yolk-sac larval stages." *Oceanografika*, 1996: 1-26.

Minagawa, M. y Wada, E. "Stepwise enrichment of ^{15}N along food chains: further evidence and the relation between $\delta^{15}\text{N}$ and animal age." *Geochim Cosmochim*, 1984: 48, 1135–1140.

Motos, L., Álvarez, P. y Uriarte, A. "Distribution pattern of hake (*Merluccius merluccius* L.) eggs and larvae in relation to environmental conditions in the Bay of Biscay in winter and early spring." *Oceanografika*, 2000: 273-292.

Murua, H. y Saborido-Rey, F. "Female reproductive strategies of marine fish species of the North Atlantic. ." *J. Northwest Atlantic Fisheries Science Vol.33*, 2003: 23-31.

Muus, B.J. y Nielsen, J.G. *Sea fish. Scandinavian Fishing Year Book*. Hedehusene, Denmark, 1999.

Olivar, P., Quílez, G. y Emelianov, M. "Spatial distribution and abundance of European hake, *Merluccius merluccius*, eggs and larvae in the Catalan coast (NW Mediterranean)." *Fisheries Research*, 2003: 321-331.

Palomera, I., Olivar M.P. y Morales-Nin, B. "Larval development and growth of the European hake *Merluccius merluccius* in the northwestern Mediterranean." *Scientia Marina*, 2005: 251-258.

Pepin, P. y Dower., J.F. "Variability in the trophic position of larval fishin a coastal pelagic ecosystem based on stable isotope analysis." *J. Plankton Res.*, 2007: 29. 8, 727-737.

Perez, K.O. y Fuiman, L.A. "Maternal diet and larval diet influence survival skills of larval red drum *Sciaenops ocellatus*." *J. Fish. Biol.*, 2015: 86, 1286-1304.

Polunin, N.V., Morales-Nin, B., Pawsey, W.E., Cartes, J.E., Pinnegar, J.K. y Moranta, J. "Feeding relationships in Mediterranean bathyal assemblages elucidated by stable nitrogen and carbon isotope data." *Mar Eco Pro Ser*, 2001: 220, 13-23.

Post, D.M. "Using stable isotopes to estimate trophic position models, methods, and assumptions." *Ecology*, 2002: 83. 3, 703-718.

Quémener, L., Suquet, M., Mero, D. y Gaignon, J.L. "Selection method of new candidates for finfish aquaculture: the case of the French Atlantic, the Channel and the North Sea coasts." *Aquatic Living Resources*, 2002: 293-302.

Sánchez, F.J., Cal, R., Otero, J.J., Lago, M.J., Gómez, C. y Iglesias, J. "The first spontaneous spawning of European hake *Merluccius merluccius* L.: characteristics of eggs and early larval stages." *Aquaculture Research*, 2011: 1-5.

Schell, D.M., Saupe, S.M. y Haubenstock, N. "Natural isotope abundances in bowhead whale (*Balaena mysticetus*) baleen: markers of aging and habitat use." *Eco Stu*, 1989: 68, 260–269.

Tanaka, Y., Minami, H., Ishihi, Y., Kumon, K., Eba, T., Nishi, A., Nikaido, H. y Shiozawa, S. "Prey utilization by hatchery-reared Pacific bluefin tuna larvae in mass culture tank estimated using stable isotope analysis, with special reference to their growth variation." *Aquac. Sci.*, 2010: 58,501-508.

Tanaka, Y., Minami, H., Ishihi, Y., Kumon, K., Higuchi, K., Eba, T., Nishi, A., Nikaido, H. y Shiozawa, S. "Relationship between prey utilization and growth variation in hatchery-reared Pacific bluefin tuna, *Thunnus orientalis* (Temminck et Schlegel), larvae estimated using nitrogen stable isotope analysis." *Aquac. Res.*, 2012: 1-9.

Tieszen, L.L. y Fagre, T. "Effect of diet quality and composition on the isotopic composition of respiratory CO₂, bone collagen, bioapatite, and soft tissues." *J. Lambert and G. Grupe, editors. Molecular archaeology of prehistoric human bone. Springer-Verlag, Berlin, Germany*, 1993: 123-135.

Uriarte A., García A., Ortega A., de la Gándara F. y R. Laiz-Carrion R. "Maternal transference of isotopic signature ($\delta^{15}\text{N}$, $\delta^{13}\text{C}$) and its evolution during ontogenic development of reared Blue fin larvae, *Thunnus thynnus* (Linnaeus, 1758)." *In: Ríos, P.; Suárez, L.A. & Cristobo, J. (Eds.). Proceedings of the XVIII Marine Biology Studies Symposium, Spanish Institute of Oceanography Editore. Gijón, Spain, 2014. 252 pp: 103 pp.*

Uriarte A., Quintanilla J.M., Garcia A., Pinheiro C., Bode A. y Laiz-Carrion R. "Lipid correction for stable isotopes analysis in european hake *Merluccius merluccius* early juveniles." *37th Fish Larval Conference. Miami (EEUU), 2013.*

Uriarte, A., García, A., Ortega, A., De la Gandara, F., Quintanilla, J. y Laiz-Carrion, R. "Discrimination factors patterns ($\Delta^{15}\text{N}$, $\Delta^{13}\text{C}$) of Atlantic bluefin tuna (*Thunnus thynnus*) larvae: the effect of maternally transmitted and relative contribution of diets in early juveniles." *Aquaculture*, 2016: En revisión.

Valdés, L., Lago de Lanzós, A., Solá, A., Franco, C., Sánchez, P. y Álvarez, P. "Hake, mackerel and horse mackerel distribution of eggs and larvae in relation to geostrophic circulation in the Bay of Biscay." *ICES C.M.* 1996/S, 1996.

Walker, J.L., Macko, S.A. y Potter, C.W. "Stable isotopes correlate the diets of modern and historic bottlenose dolphin populations." *Mar MammRes*, 1999: 15, 335-350.