



Facultad de Ciencias del Mar y Ambientales
Departamento de Biología

DESARROLLO ONTOGÉNICO DE
***Acipenser naccarii*, (Bonaparte, 1836).**
POSIBLE APLICACIÓN EN ACUICULTURA

TESIS DOCTORAL
Remedios Cabrera Castro
Cádiz, 2009

UNIVERSIDAD DE CÁDIZ
Facultad de Ciencias del Mar y Ambientales
Departamento de Biología

TESIS DOCTORAL

“DESARROLLO ONTOGÉNICO DE
***Acipenser naccarii*, (Bonaparte, 1836).**
POSIBLE APLICACIÓN EN ACUICULTURA”

Memoria presentada por la Licenciada en Ciencias del Mar, *REMEDIOS CABRERA CASTRO* para optar al grado de Doctor en Ciencias del Mar por la Universidad de Cádiz.

DIRECTORES DEL TRABAJO:

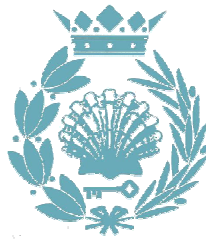
Dr. José A. Hernando Casal
Prof. Titular Dpto. Biología

Dra. Cristina Zabala Giménez
Prof. Titular Dpto. Biología

ASPIRANTE:

Lda. Remedios Cabrera Castro

Cádiz, marzo 2009



D. JOSÉ ANTONIO HERNANDO CASAL y D^a. CRISTINA ZABALA GIMÉNEZ,
Profesores Titulares del Área de Zoología de la UNIVERSIDAD DE CÁDIZ,

HACEN CONSTAR:

Que el trabajo recogido en la presente Memoria de Tesis Doctoral, titulada:

*“DESARROLLO ONTOGÉNICO DE *Acipenser naccarii*, (Bonaparte, 1836). POSIBLE APLICACIÓN EN ACUICULTURA”*, presentada por Remedios Cabrera Castro, en el Departamento de Biología de la Facultad de Ciencias del Mar y Ambientales de la Universidad de Cádiz, ha sido realizado bajo nuestra dirección. Considerando que constituye trabajo de tesis y que reúne todos los requisitos legales, autorizamos su presentación y defensa para optar al grado de Doctor en Ciencias del Mar por la Universidad de Cádiz.

Cádiz, Marzo de 2009

Fdo. Dr. D. José A. Hernando Casal

Dra. Dña. Cristina Zabala Giménez

Todos los estudios que se recogen en la presente memoria se han llevado a cabo en el Departamento de Biología de la Universidad de Cádiz gracias al apoyo económico del proyecto de investigación titulado “*Desarrollo de Sistemas Orgánicos implicados en la alimentación, la conducta y la distribución interna del esturión Acipenser naccarii. Aplicaciones a su cultivo.* (AGL2000-0382-P4-05), del Ministerio de Ciencia y Tecnología.

Los ejemplares de esturión empleados en el presente estudio proceden y fueron mantenidos en las instalaciones de la Piscifactoría Sierra Nevada S. L., en Riofrío (Granada)

Asimismo, algunos de los resultados recogidos en esta memoria han sido presentados a diferentes Congresos, gracias a la financiación del OPAM (Observatorio de Pesca Andalucía-Marruecos):

- IX Congreso Nacional de Acuicultura. Cádiz, 2003
- Symposium Globec-Imber. Valencia, 2007.
- XI Congreso Nacional de Acuicultura. Vigo, 2007.
- ECI XII European Congress of Ichthyology. Catvat (Croacia), 2007.
- II Congreso Nacional de Acuicultura. Universidad Temuco (Chile), 2009.

A Pablo e Isabel

*Cuando no puedas correr, camina,
cuando no puedas caminar, usa el bastón.
Pero nunca te detengas.
(Madre Teresa de Calcuta)*

*Todo le llega a quien sabe esperar
(L. Tolstoi)*

Y por fin, “el tercer parto”...., este sí que ha sido largo, una gestación de varios años en la que han existido muchos momentos buenos y otros no tan buenos o de bajón, en los que mi vida ha sufrido cambios importantes tanto a nivel universitario como a nivel personal que claramente me han influido.

Comencé mi andadura por el departamento de Biología como alumna en mi segundo año de carrera, siempre me habían gustado los “bichos” pero “bichos hay muchos” y... ¿cómo saber si la elección había sido la adecuada?. Un año como alumna “por hobbie” me bastó para saber que sí quería estar en el grupo de “Dinámica de Poblaciones de Peces”, bueno el grupo de Pepe Peces. Luego llegaron las becas, no becas, periodo de sequía y por fin... un contrato, se abrió la oportunidad de plantearme hacer una Tesis Doctoral (uff!!!, qué reto!!).

Es difícil resumir todos los sentimientos que te surgen en un momento como este en el que sabes que estás a punto de cerrar una etapa, comenzar otra y en el que tienes que resumir lo que te ha pasado en varios años. En un periodo en el que has conocido tanta personas que te han ido aportando tantas cosas, que te han servido para crecer a nivel científico y por supuesto a nivel personal. Entenderéis que es difícil saber por donde empezar.

Así que antes de comenzar los agradecimientos concretos me gustaría hacer un agradecimiento general a todas aquellas personas que me han aportado técnicas, conocimientos y buen hacer científico, a las que han participado en las actividades propias del laboratorio y a las que han sido pilares esenciales en mi formación. Un camino muy largo en el que me he encontrado a mucha gente.

Por supuesto, que durante todo este tiempo también me han ocurrido otras muchas cosas dentro y fuera del ámbito universitario y que estos acontecimientos están íntimamente relacionados entre sí. Por ello, no he de olvidar a todos aquellos amigos que han compartido más o menos intensamente dichos acontecimientos.

Este es sin duda el lugar adecuado para dejar constancia de unas palabras de gratitud hacia todos ellos. Quizás se alargue un poco pero intentaré reflejar un sentimiento en toda su extensión aunque para algunos resulte exagerado.

Me gustaría dar las gracias a todos aquellos que de alguna forma me han ayudado o han participado o simplemente me encontré en el camino, pero que por alguna razón, fundamentalmente el paso de los años, el cambio de prioridades a lo largo del tiempo o simplemente “el despiste”, se me ha olvidado mencionar. También a aquellos otros que me pusieron trabas o me desanimaron en mi trabajo o en lo personal porque como siempre dice mi madre “no todo el mundo es bueno y te quiere bien”, gracias a ellos aprendí a salir airosa, a “saltar los obstáculos”, a resolver situaciones y valorar qué y quien realmente vale la pena.

Dicho todo esto quiero comenzar por la parte más formal aunque como dicen los matemáticos “el orden de los factores no altera el producto”.

En primer lugar, agradecer a mis directores de tesis José A. Hernando (Pepe Peces) y Cristina Zabala su dedicación, paciencia y esfuerzo en toda esta aventura, en especial al “jefe” que me brindó la oportunidad de trabajar en su grupo de investigación, de mostrarme lo divertido de los muestreos de campo y la recompensa de después (el buen comer) y sobre todo de picarme la curiosidad con “esos bichos to raros” que son los esturiones. Pepe, te agradezco la confianza que depositaste en mí desde el primer día y que ha ido creciendo en todo este tiempo, agradezco tu comprensión a mi situación personal en los diferentes momentos, tu esfuerzo y seguimiento.

A Cristina Zabala, por permitirme ser su alumna colaboradora y abrirme las puertas hacia mi carrera profesional.

A (MacGiver), Jose de Mena Martínez, ese profesional del CITI que salvo mi disco duro con 3 cablecitos cuando no tenía la última copia de seguridad de lo que llevaba de la tesis, gracias a él todas esas horas de trabajo no cayeron en saco roto. Muchas gracias.

A Alberto Domezain y a todo su equipo por su inestimable labor, desde el Departamento I + D de la Piscifactoría “Sierra Nevada”, en la cría y mantenimiento de los ejemplares de Acipenser naccarii, que se han utilizado en este trabajo.

Me gustaría dar las gracias muy afectuosamente a Valentín Sans Comas y “todos los niñ@s” de su equipo que durante una semana me mostraron las técnicas inmunohistoquímicas y “las sinfonías de las canciones de nuestra infancia” y en especial a Tere que se preocupó, contestó y resolvió todas las dudas y además le quedaron fuerzas para llevarnos de marcha y enseñarnos los “lugares emblemáticos de la noche malaqueña”.

A Mila “la jefa”, siempre gracias, por resolver todas mis dudas, por aconsejarme antes de ir a hablar con el jefe, por tu ayuda inestimable con los secretos del Power Point y con los análisis estadísticos, por tu opinión y sobre todo por sacar tiempo de donde no hay. Sé que todo el esfuerzo que realizas con todos nosotros no siempre esta valorado en su justa medida. Mil gracias.

A Mamen, por tu ayuda inestimable en todos los sentidos laboral y personal. Por buscarme las citas bibliográficas que me faltaban, por darme tu opinión con las fotos, por ayudarme con los escritos y el papeleo, por los buenos ratos en el laboratorio y los no tan buenos, por tus consejos, por hacer de intermediaria, por tu apoyo, por enseñarme a que a veces hay que ser “políticamente correcta”, por escucharme y sobre todo por brindarme tu confianza y enseñarme que la verdadera amistad como el buen vino “mejora con los años”.

A Pepe Díaz por esos ratitos de risas y “hablemos de sexo” en el laboratorio y en el coche de camino a la Facul.

A mis compis del laboratorio los antiguos (Miguel, Rafa, Carlos, Patri), y (Mon, César, Noe, gracias por las barbacoitas y los ratitos buenos en el campo) los del medio (Jesús Aragón, Iratxe, Mayte, Miguelito, Eva y Natalia) y en especial a Javi e Ivonne que en determinados momentos fueron apoyos y psicólogos imprescindibles, por las risas en los muestreos de Tarifa y por las bromitas de Javi en el laboratorio que en los momentos tensos relajaban el ambiente. Y a los más nuevos (Tamara, Paco, gracias por pringaros con la bibliografía y las revisiones de pies de figuras y tablas, Felipe, Jesús, Vicky, Rocío y en especial a Carlos por ayudarme con los últimos flecos de la tesis y montar el video de desarrollo). También a los que vinieron de fuera (Mich, Davide, Anne-Lise, Juan Carlos, Mohamed y el “terror de los ordenadores”, Maha, es que los tienes a todos loquitos. Muchas gracias por todo.

A los que participaron en los muestreos del esturión, en Riofrío (Cristina, Davide, Eva, María y Pepe) que se emocionaron cuando vieron latir el corazón y descubrieron que era verdad lo que se estudiaba en Biología. A ellos que no les importó hacer turnos de mañana, tarde y noche. Gracias.

Muchas gracias a mi compañera y amiga Ivone por enseñarme que a los ordenadores como a las plantas también hay que hablarles de vez en cuando para que te hagan caso, por ayudarme con la informática en general, la maquetación, por pelearte con las fotos y tablas para que encajen en una página, en fin, por realizar ese trabajo nada agradable para la mayoría de los humanos que es mezclar word, tablas e imágenes y conseguir que se estén quietas y en su sitio. Además te agradezco los consejos, tu ánimo y comprensión en todo momento personal y laboral.

A mis niñas del “Reflejo Verde”, esas 10 + 1 mujeres, Antonia, Carmela, Gloria, Inés, Lourdes, Lola, Magda, Marina, Susana, Yoli (está en orden alfabético para que no os enfadéis) y Cristina, que siempre me escucharon como docente y principalmente como persona. De vosotras yo sí que aprendí, a valorar las cosas: que la edad no cuenta cuando hay ganas de trabajar, que más hace “el que quiere que el que puede”, que existen verdaderos problemas y que lo que la mayoría de la gente tiene son en realidad preocupaciones, que hay pequeños momentos inolvidables. Gracias por enseñarme las mil y una “manualidades” que se pueden hacer de lo que “no servía”, por las “vivencias” del embarazo, lo bueno y lo malo. Gracias por “amadrinar” a Pablo.

A mis amigas y sus parejas, las que están cerca Montse, Patri, Mercedes y M^a Carmen “por sacarme de vez en cuando”, hacer filigranas para cuadrar agendas y aguantar sin que se os note el aburrimiento del monotema “Tesis”, y a las que están un poquito más lejos pero que nunca han dejado de animarme vía e-mail o por teléfono (Laura y Dori). Haber para cuando nuestros signos están en conjunción y podemos volver a reunirnos.

A mis amigos “tiñosos”, no os enfadéis, sabéis que lo digo con todo el cariño, a Chema, Julián-Pili, Juan, Mayte, Ana - Tato, Patri-Fernando, Ana y Manolo, gracias por todos esos ratitos buenos, por las ferias, las comidas, tapeítos,....

A mi amigo Juan Ángel por tenerme en sus oraciones allá donde está, supongo que viene bien de vez en cuando tener a alguien que tenga hilo directo con el de arriba.

A mi cuñad@ Carmen – José Luis y a Lourdes - Diego por cuidar de Pablo e Isabel en cualquier momento que lo necesitaba para poder venir a la Facultad. Gracias a vosotros he podido al fin acabar este trabajo.

A mi pequeña familia adoptiva del sótano, que durante 3 meses me enseñaron la otra parte de la Acuicultura, la de Cultivos Marinos y fueron pacientes conmigo en mi proceso de aprendizaje.

A Ana Álvarez, por su paciencia, ayuda, sus consejos y los ratitos de risas del desayuno, gracias Ana.

A mi familia,

en primera instancia a mis padres Ildelfonso y Carmen por su apoyo ilimitado en todo momento desde que comencé a estudiar, por sus palabras de aliento, por estar ahí desde el principio, por tirar del carro conmigo y por confiar en mí.

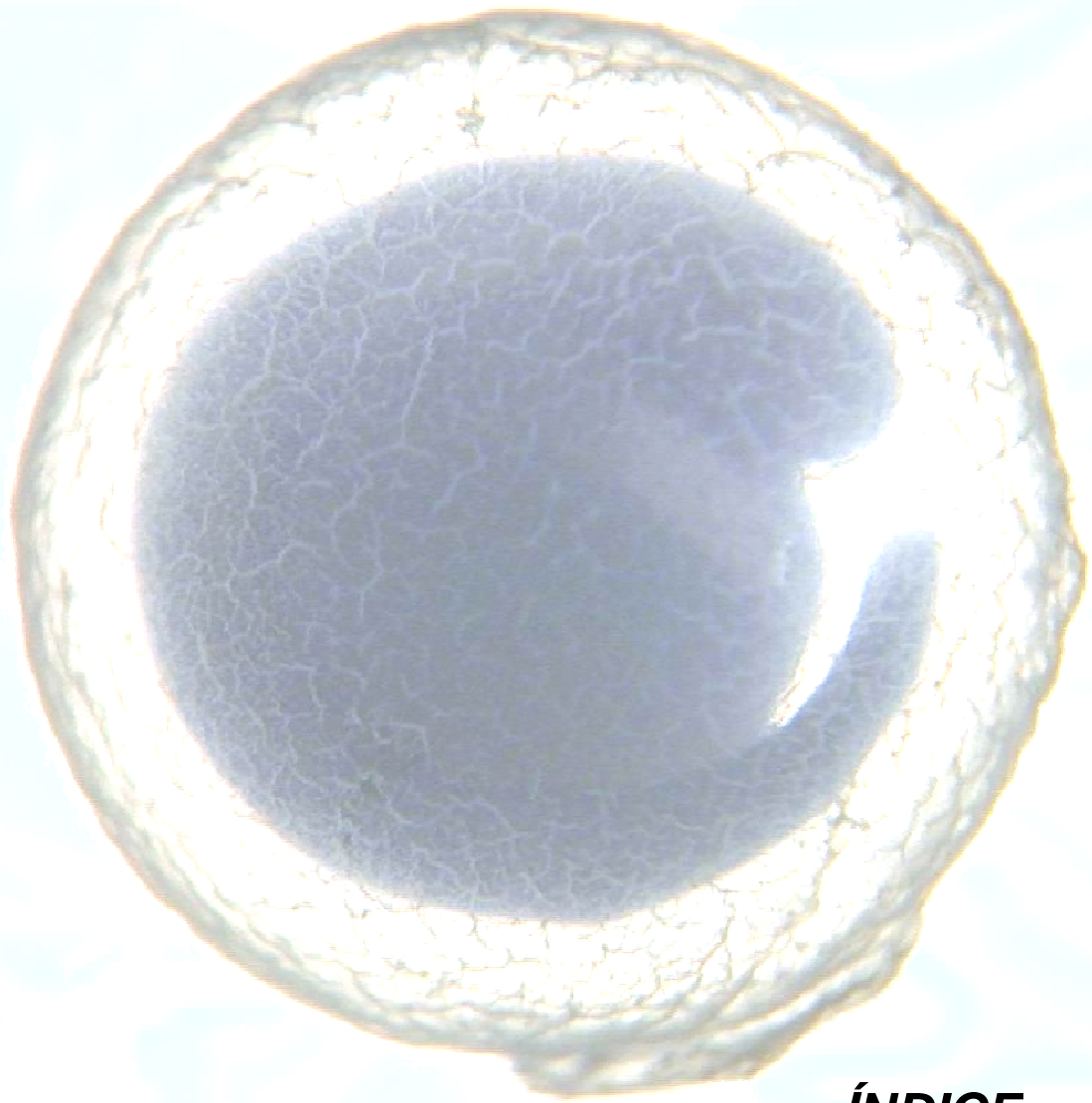
A mi abuela Pepa, por repetirme continuamente “ánimo al bombo”, por enseñarme a no rendirme y a luchar diariamente por lo que uno cree, y a dar capotazos a los tiempos difíciles. Eres el mejor ejemplo a seguir. También a mi abuelo Juan, que aunque nos dejó demasiado pronto, sé que me ha dado fuerzas para seguir.

A mis hermanas (M^a José, Luz del Carmen y Noelia) por poder contar con vosotras siempre, por vuestro aliento y empujoncito y por lo bien que lo pasamos cuando estamos todas juntas.

A mis dos tesoros, mi tesoro grande, Pablo, y mi tesoro chico, Isabel, que con tan solo 3 y 1 año respectivamente ha soportado la ausencia de mamá, las idas y venidas al laboratorio ya desde su gestación. Porque vosotros me habéis dado la fuerza necesaria para no tirar la toalla, para seguir adelante y para llevar todo esto a buen puerto. Siempre he dicho que parte de esta tesis la habéis hecho vosotros. Gracias mis pequeños.

Por último y no menos importante he de agradecer infinitamente el apoyo incondicional de Juan Antonio, mi marido y compañero desde los 19 años, con el que he vivido todo este camino. Porque sin ti no lo hubiese conseguido, por tu confianza, por ser mi pilar en todo momento, por no hacer preguntas ni pedir justificación a lo que hacía cuando ni siquiera tenía contrato, teníamos los dos niños y había que hacer virguerías para llegar a fin de mes. Sólo una persona con tu nobleza, corazón y sin tener idea de cómo va el mundo de la investigación puede ser capaz de soportar una situación así tan prolongada en el tiempo.

A todos mil gracias de corazón.



ÍNDICE

ÍNDICE

Abreviaturas	1
JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS.....	3
Justificación	5
Objetivos	7
CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN	9
1.1 Acipenseriformes	12
1.2 Posición taxonómica.....	13
1.3 <i>Acipenser naccarii</i>, Bonaparte, 1836.	15
1.3.1. <i>Biología</i>	15
Reproducción.....	16
Migraciones	16
Ecología y hábitat.....	16
Cariotipo	16
1.3.2. <i>Distribución geográfica</i>	17
1.3.3. <i>Características que lo diferencian de otros Acipenséridos</i>	18
1.4 Desarrollo	19
1.4.1. <i>Breve reseña histórica</i>	19
1.4.2. <i>Embriología</i>	20
1.4.3. <i>Embriogénesis de los esturiones</i>	21
Fecundación	21
Periodos de segmentación y blastulación	22
Periodo de Gastrulación.....	23
Neurulación.....	23
Eclosión.....	24
CAPÍTULO 2. MATERIAL Y MÉTODOS	27
2.1 Material biológico y zona de muestreo	29
2.1.1. <i>Zona de muestreo</i>	29
2.1.2. <i>Material biológico</i>	30
2.1.3. <i>Muestreos</i>	31
2.2 Estudio y descripción de los especímenes.....	34
2.2.1. <i>Nomenclatura utilizada</i>	34
2.2.2. <i>Estadios de desarrollo</i>	35
2.3 Técnica de tinción	36
2.4 Apendices.....	38
2.4.1. <i>Protocolos utilizados</i>	38

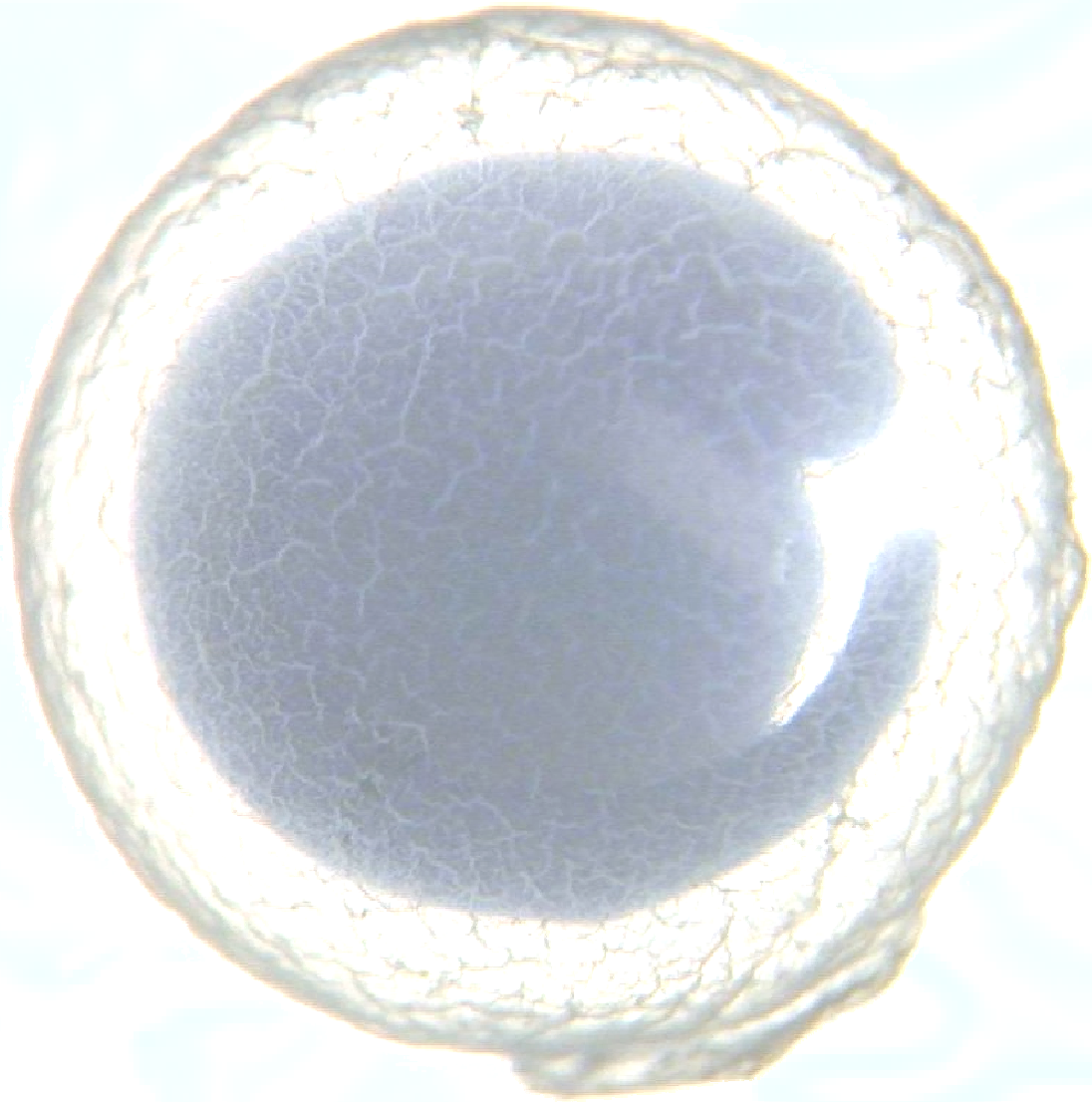
Fijación del material	38
Tinción cartílago–hueso (protocolo 1-2).....	38
Tinción cartílago–hueso (protocolo 3), modificado	39
2.4.2. Soluciones.....	41
CAPÍTULO 3. RESULTADOS	43
3.1. Desarrollo Embrionario de <i>A. naccarii</i>.....	46
3.1.1. <i>Primeros estadios del desarrollo embrionario de A. naccarii</i>	46
Huevos no fecundados.....	46
3.1.2. <i>Periodo de Fecundación</i>	47
Estadio 2.....	47
3.1.3. <i>Periodo de segmentación y blastulación</i>	48
Estadio 3.....	48
Estadio 4.....	48
Estadio 5.....	48
Estadio 6.....	48
Estadios 7 y 8	50
Estadio 9.....	50
Estadios 10 y 11.....	50
Estadio 12.....	50
3.1.4. <i>Periodo de Gastrulación</i>	52
Estadio 13.....	52
Estadio 14.....	52
Estadio 15.....	52
Estadio 16.....	52
Estadio 17.....	54
Estadio 18.....	54
3.1.5. <i>Periodo de neurulación</i>	54
Estadio 19.....	54
Estadio 20.....	54
Estadios 21 y 22.....	56
Estadio 23.....	56
Estadio 24.....	56
Estadios 25 y 26.....	58
Estadio 27.....	58
Estadio 28.....	60
Estadio 29.....	64
Estadio 30.....	66
Estadios 31 y 32.....	68
Estadio 32.....	68
Estadios 33 y 34.....	70

3.1.6.	<i>Periodo de Eclosión</i>	70
	Estadio 35.....	70
	Estadio 36.....	70
	<i>Láminas Desarrollo Embrionario (1-5)</i>	77
3.2	Embrión de vida libre	90
	Estadio 36 (Dettlaff & Ginsburg, 1954): Eclosión en masa (Tm).....	90
	Estadio 37	92
	Estadio 38.....	94
	Estadio 39.....	96
	Estadio 40.....	98
	Estadio 41	100
	Estadio 42.....	102
	Estadio 43.....	104
	Estadio 44.....	106
	Estadio 45.....	108
	<i>Láminas de Embrión de Vida Libre (7 – 9)</i>	113
3.3	Etapa Juvenil	122
	Estadio 46 (8 dpe).....	122
	Estadio 47 (9 y 10 dpe)	124
	Estadio 48 (11 - 13 dpe).....	127
	Estadio 49 (14dpe – 26 dpe)	132
	Estadio 50 (26 dpe – 66 dpe)	138
	Estadio 51 (66 dpe – 81 dpe)	149
3.4	Análisis morfométricos	163
CAPÍTULO 4. DISCUSIÓN		171
CONCLUSIONES		203
BIBLIOGRAFÍA		207
	Relación de Figuras, Tablas y Láminas	229
	Figuras	229
	Tablas	238
	Láminas	238
ANEXO	239

Abreviaturas

A _I , A _{II}	rudimentos del 1er y 2º par de arcos viscerales
AB	blastómeros polo animal
AD	arteria dorsal
AF	base pigmentada del arquenteron visto desde el techo del arquenteron en el lado dorsal
aF	aleta anal
an	vista desde el polo animal
AO	arco aórtico
AR	región animal
ATC	comisura anterior transversal
AV	vesícula auditiva
b	barbillas; rudimento de las barbillas
br	branquias; rudimento del surco branquial
brf	filamentos branquiales
Bc	blastococele visto desde la capa de células externas
Bp	blastoporo
Br	cerebro; rudimento del cerebro
CD	parte colectora del conducto nefrítico
CF	aleta caudal
CR	rudimento de la cloaca
CuD	conductos de Cuvier
d	vista desde el lado dorsal
DF	aleta dorsal
E	ojo
ER	rudimento del ojo
esc	escotadura
Ex	rudimento del sistema excretor
F1, F2, F3	1er, 2º, 3º, ... surcos de división
FF	rudimento del pliegue de la aleta (membrana aletil)
flx	flexión del extremo caudal
h	vista desde el lado de la cabeza
HG	glándula de eclosión
Ht	corazón; lugar de formación del rudimento del corazón
JC	coloide hidrófilo
i	iris
l	labios
lat	vista lateral
LC	luna creciente
LL	línea lateral
LLE	borde del labio inferior donde éste es interrumpido
LPS	punto polar claro
m	boca; lugar de apertura de la boca

Me	mesencéfalo
MyC	cavidad del mielencéfalo
MZ	zona marginal
n	narina
NF	pliegue neural
NG	surco neural
NP	placa neural
o	opérculo
OS	saco olfativo
P	pínnulas
PD	conducto nefrítico; rudimento del conducto nefrítico
Pe	prosencefalo
pe	post-eclosión;
dpe	días post-eclosión
PF	aleta pectoral
pf	post-fecundación;
dpf	días post-fecundación
PAR	rudimentos apéndices pilóricos
PR	lugar de formación del rudimento de la glándula pituitaria
PreF	aleta preanal
PT	túbulos nefríticos
Re	rombencéfalo
r	radios; rr rudimento de los radios
SDR	rudimento escudetes dorsales
SD	escudetes dorsales
SD1º	escudetes dorsales primarios
SD2º	escudetes dorsales secundarios
SG	válvula espiral
SL	escudetes laterales
SLR	rudimentos escudetes laterales
So	somitos
Su	surco a lo largo de la línea de fusión de los bordes de la placa neural
SV	escudetes ventrales
t	vista desde el lado caudal
T	cola
Te	eclosión de los primeros embriones
Tm	eclosión en masa
v	vista desde el lado ventral
VB	blastómeros polo vegetativo
VF	aletas ventrales
VR	región polo vegetal
y	primordios musculares
YP	tapón de vitelo



Justificación y objetivos

Justificación

La acuicultura tiene una historia de 4000 años, pero ha sido desde hace 50 cuando se ha convertido en una actividad económica relevante. Es una actividad que abarca aspectos muy variados y una amplia gama de especies, sistemas y prácticas. Su dimensión económica ofrece nuevas oportunidades gracias a la creación de empleo, a la utilización más eficaz de los recursos naturales y a las oportunidades en inversión productiva. La acuicultura también contribuye cada vez más al comercio local e internacional.

El éxito de la acuicultura moderna se basa en el mejor conocimiento de su biología, en el control sobre la reproducción de las especies, en las innovaciones tecnológicas y en el desarrollo de alimentos específicos.

Durante las tres últimas décadas la acuicultura ha crecido, se ha diversificado e intensificado y ha registrado grandes adelantos tecnológicos. El potencial de estos avances para el crecimiento económico, el comercio, la mejora de los niveles de vida y el incremento en la seguridad alimentaria, han sido reconocidos por la FAO en su *Declaración y Estrategia de Bangkok (2000)* que subraya que se debe continuar con su desarrollo hasta ofrecer todo su potencial a la humanidad.

La Comisión Europea ha reconocido la importancia de la acuicultura en su Política Pesquera Común (PPC) y ha expresado la necesidad de propiciar una estrategia para el desarrollo de esta actividad en un documento específico para la acuicultura denominado "*Una estrategia para el desarrollo sostenible de la acuicultura europea (COM (2002) 511 final)*".

El interés en el desarrollo de la acuicultura de las especies de esturión crece en Europa (Bronzi *et al.*, 1999). Algunos esturiones se cultivan en Europa desde hace algún tiempo. Los primeros se produjeron en Francia, con la especie *Acipenser sturio*. Actualmente se dispone de un único y escaso stock en el Centro de Investigación del CEMAGREF en Burdeos con el que se está llevando a cabo un programa de cría en cautividad y recuperación de la especie. La especie *A. naccarii* se está cultivando con éxito en agua dulce tanto en Italia como en España. En este último en la piscifactoría de Sierra Nevada S.L., en Riofrío (Granada) con el mayor stock de esta especie a nivel mundial. Sin embargo, aún existen aspectos tanto de la tecnología como del desarrollo de la especie que podrían mejorarse y aumentar su rendimiento si se mejora el conocimiento sobre su biología, genética y manejo.

Los esturiones tienen un enorme interés desde el punto de vista comercial. Son numerosos los trabajos referentes a su fisiología y, en particular, a su adaptación a ambientes de hipoxia y a diferentes niveles de salinidad del agua (Igumnova, 1975; Maxime *et al.*, 1995; Mckenzie *et al.*, 1995; Agnisola *et al.*, 1996; Cataldi *et al.*, 1998; Agnisola *et al.*, 1999; Crocker *et al.*, 2000; Mckenzie, 2001; Martínez – Álvarez *et al.*, 2002; Ojeda *et al.*, 2003). Además, existen datos sobre la cronología del desarrollo en especies tales como *Acipenser gueldenstaedti*, *A. stellatus*, *A. ruthenus*, *Huso huso* y *Pseudosaphirhynchus kaufmanni* (Dettlaff *et al.*, 1993).

En general, se han realizado importantes estudios sobre el desarrollo embrionario de algunos Acipenséridos como *A. transmontanus* y *A. medirostris* (Conte, 1998), *A. gueldenstaedtii*, *A. ruthenus*, *A. stellatus*, (Dettlaff *et al.*, 1993), *A. baerii* (Gisbert, 1999; Gisbert & Williot, 2002), *A. gueldenstaedtii* (Nathanailides *et al.*, 2002), *A. brevirostrum* y *A. oxyrhincus* (Hardy & Litvak, 2004), *A. medirostris* (Van Eenennaam *et al.*, 2005), *A. transmontanus* y *A. fulvescens* (Wang *et al.*, 1985,1987) incluyendo en algunas especies, estudios sobre el desarrollo embrionario de algunos sistemas orgánicos en particular (Gisbert *et al.*, 1998; Zeiske *et al.*, 2003).

La información existente sobre *A. naccarii*, es escasa e incompleta, Blogione y colaboradores (Blogione *et al.*, 1999), estudiaron las etapas iniciales del desarrollo de esta especie, aunque los propios autores confirman la parcialidad de su trabajo y apuntan a la necesidad de estudios más completos. En los últimos años se vienen realizando algunos estudios acerca del desarrollo de diferentes sistemas orgánicos, como los realizados sobre el desarrollo del cerebro (Vazquez *et al.*, 2002), desarrollo del corazón, (Icardo *et al.*, 2004; Guerrero, 2007), desarrollo y caracterización de receptores sensoriales (Camacho, 2008), estructura del canal alimentario (Cataldi *et al.*, 2002), sistema digestivo (Llorente, 2006), desarrollo de la glándula pituitaria (Grandi & Chicca, 2004) y desarrollo del aparato sensorial-cutáneo y el tracto digestivo (Boglione *et al.*, 1999).

La existencia de diferencias interespecíficas de orden temporal en el curso del desarrollo (Gisbert *et al.*, 1998; Bogline *et al.*, 1999) hace imprescindible esta línea de investigación y justifica un estudio exhaustivo que permita determinar cronológicamente el desarrollo embrionario en *A. naccarii*. Así mismo, el interés de los estudios comparados y la rápida expansión de la industria de la acuicultura han provocado un incremento considerable de los estudios en peces en los últimos años. Se plantea la transferencia de los datos obtenidos a las prácticas de cultivo intensivo, lo que contribuirá a la diversificación de especies cultivadas, tarea considerada de interés prioritario en Acuicultura.

Objetivos

Este trabajo se centra en el análisis del desarrollo embrionario y ontogénico de *Acipenser naccarii*, (Bonaparte, 1836), analizando la cronología del desarrollo y la aparición a nivel morfológico de las diferentes estructuras.

Es importante elaborar un modelo global que relacione la morfogénesis a nivel macroscópico y los diferentes sistemas orgánicos de *A. naccarii*, para obtener mejor conocimiento sobre sus pautas de desarrollo.

Además, es importante iniciar el estudio macroscópico de las estructuras externas desde el estado de cigoto hasta llegar al estadio de alevín, lo que proporcionará la posibilidad de establecer un cronograma de aparición de las principales estructuras a este nivel.

Para ello se han establecido los siguientes objetivos específicos:

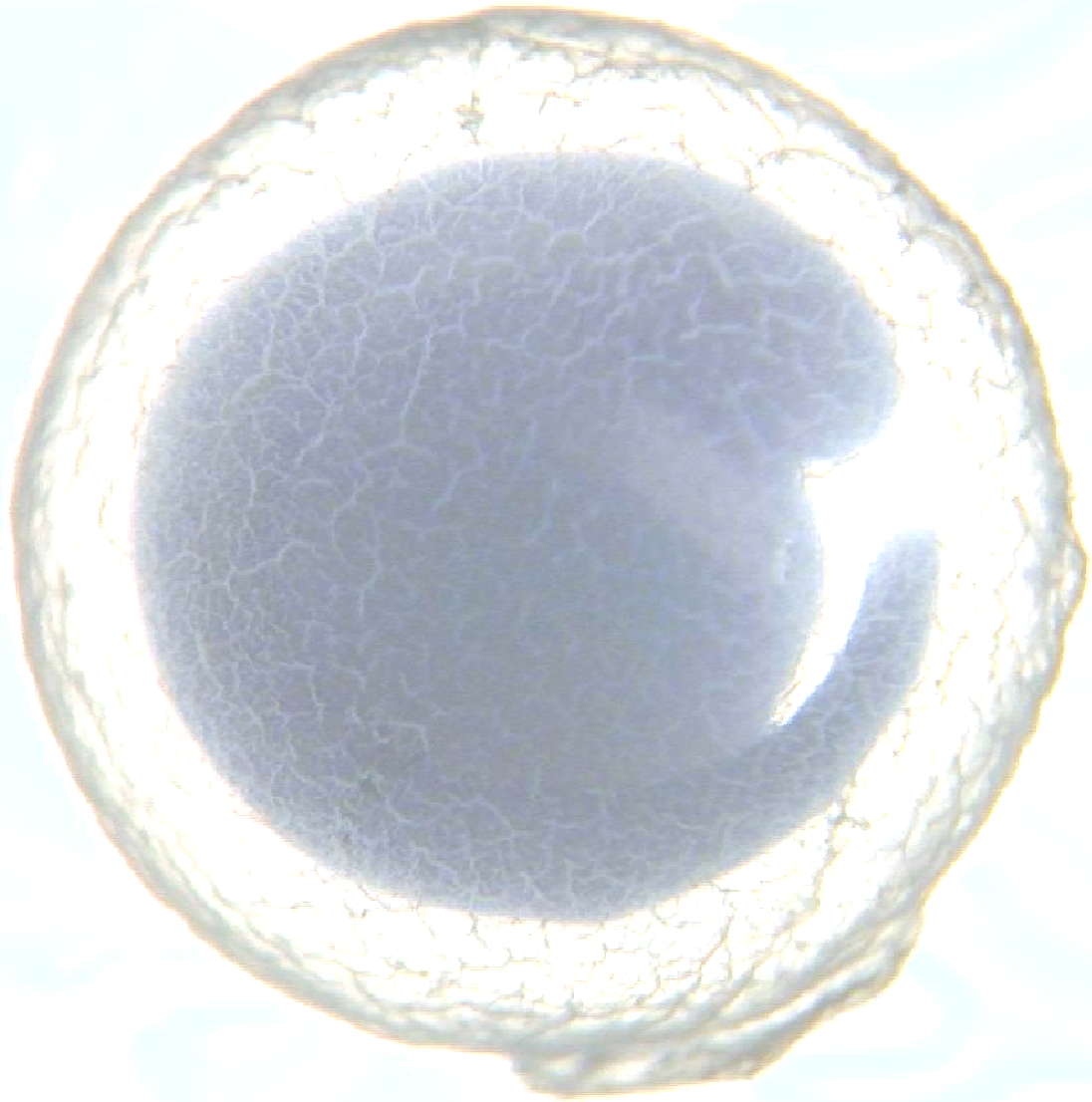
1. Describir el desarrollo embrionario y ontogénico del esturión *A. naccarii*, estimando la cronología y describiendo los patrones morfológicos característicos de cada uno de los estadios de desarrollo. Este apartado se divide a su vez en tres subapartados.

Primeros estadios del desarrollo embrionario. Abarca desde el momento de la fecundación del huevo, hasta el momento de la eclosión, justo antes del estadio 36 (eclosión en masa) (Dettlaff *et al.*, 1993).

Embrión de vida libre. Abarca el periodo desde la eclosión hasta la reabsorción de la totalidad del saco vitelino (Estadios 37 – 45).

Etapa juvenil. En nuestro caso se extiende hasta los 3 meses de edad post – fecundación (pf).

2. Descripción pormenorizada de la diferenciación y el desarrollo de las diferentes estructuras externas estudiando la morfogénesis de las aletas pares, impares y la formación de los escudetes.
3. Establecer las posibles relaciones biométricas entre las diferentes estructuras estudiadas y la longitud, así como, su variación con el tiempo.



Capítulo 1. Introducción

Entre los Actinoptergios actuales, los Condrósteos constituyen un taxón muy antiguo, que ha habitado las aguas al menos desde el Jurásico (Bemis *et al.*, 1997), y los Acipenseridae, son un antiguo grupo de peces que preservan características estructurales primitivas relacionadas con los Condrósteos.

La estructura de sus huevos, distinta a los de la mayoría de Teleósteos, es muy similar a la de los Anfibios, ya que tienen inclusiones de vitelo distribuidas por todo el citoplasma, y son también similares en muchas características de la morfogénesis, en las que los Acipenseridae difieren de los Teleósteos (Dettlaff *et al.*, 1993).

Este grupo, al que pertenecen los esturiones, tiene un enorme interés científico por su posición y antigüedad filogenética y además constituye un punto intermedio entre los Condrictios y los Actinoptergios (Colbert, 1955; Carroll, 1998) (Figura 1).

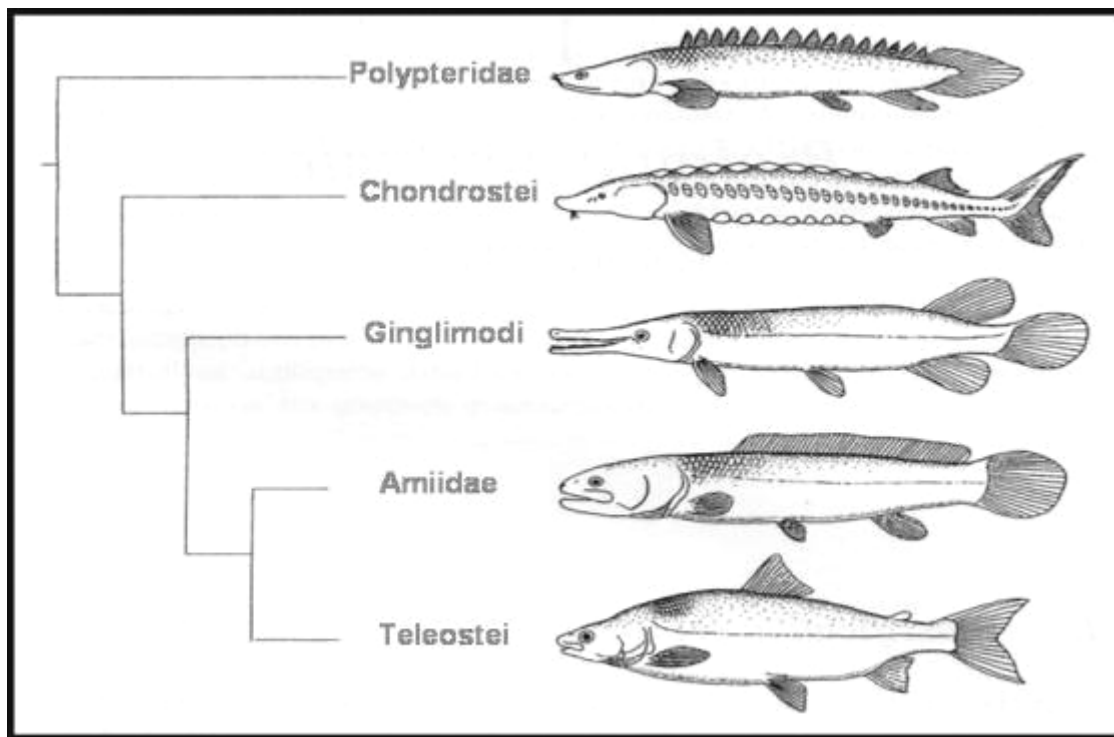


Figura 1. Representación de las 5 líneas que constituyen el grupo de los Actinoptergios, (adaptada de Bemis *et al.*, (1997); Billard (2002)).

1.1 Acipenseriformes

Los esturiones, pertenecientes al orden de los Acipenseriformes, están considerados como reliquias o “fósiles vivientes” (Gardiner, 1984), ya que su aspecto apenas ha variado a lo largo de 200 millones de años (Billard, 2002). Se pueden encontrar ampliamente distribuidos en el Hemisferio Norte, por encima del paralelo 30°, (Gardiner, 1984; Findeis, 1993; Bemis *et al.*, 1997; Choudhury *et al.*, 1998), y dentro de estas zonas, su distribución está repartida a lo largo de las costas del Atlántico y del Pacífico, los mares Negro y Mediterráneo, así como ríos, lagos y mares cerrados.

Los Acipenseriformes, como grupo, se caracterizan por poseer una serie de características ancestrales que sugieren una posición basal dentro de los Osteíctios más recientes. Estos caracteres son:

- Escamas ganoideas pesadas
- Aleta caudal heterocerca
- Esqueleto cartilaginoso: se piensa que éste es un carácter secundario en las formas actuales (no homólogo al de los Condríctios), ya que los fósiles del grupo indican la presencia de un esqueleto óseo.
- Presencia de espiráculo
- Los radios de las aletas son más numerosos que sus soportes basales.

La familia Acipenseridae incluye especies anádromas (viven en el mar y migran hacia los ríos para la puesta), especies semianádromas (pasan la mayor parte de su vida en los ríos y hacen migraciones dentro de las regiones estuarinas pero no van hacia mar abierto), y potádromas (residentes en los ríos) de agua dulce.

Su abundancia hace que existan enormes rangos ampliamente diferenciados. En muchas partes se han encontrado como poblaciones esparcidas, mientras que aisladas en número significativo, sólo en unas pocas regiones. La mayoría se encuentran en la depresión del Ponto-Caspio, en los Mares Azov y Negro, (Dettlaff *et al.*, 1993). Su distribución de abundancia en muchas regiones, y su completa desaparición en algunos lugares, debido a la competencia con peces modernos, se ha considerado como indicativo de que son un grupo relictivo (Magnin, 1959; Gerbil'skii, 1962).

Este antiguo grupo está perfectamente adaptado a las condiciones ambientales contemporáneas y todavía tiene grandes ventajas si se le compara con los teleósteos, (Dettlaff *et al.*, 1993). Estas ventajas incluyen:

- amplio rango de temperatura de puestas
- mayor capacidad de los huevos para retener el esperma
- temprana eurihalinidad de los juveniles
- amplio espectro de alimentación
- protección frente a depredadores, los individuos desde muy jóvenes están dotados de “escudetes”
- plasticidad ecológica, la existencia de formas anádromas, semianádromas y potádromas,...

1.2 Posición taxonómica

Tras muchos estudios, tanto la posición filogenética como la sistemática del grupo seguían siendo inciertas, hasta que en 1997 se propuso una clasificación basada en caracteres morfológicos, osteológicos y genéticos que definen la filogenia y sistemática del grupo (Bemis *et al.*, 1997). Esta clasificación postula que la familia Acipenseridae esta constituida por unas 25 especies, de las cuales 17 pertenecen a la Tribu Acipenserini, 6 a la Tribu Scaphirhynchini (Birstein & Bemis, 1997), dos a la familia Husinea que junto a la familia Polyodontidae (*Polyodon spatula* y *Psephurus gladius*) conforman el orden Acipenseriformes (Figura 2).

Posición taxonómica de A. naccarii:

Clase Actinopterygii

Subclase Chondrostei

Orden Acipenseriformes

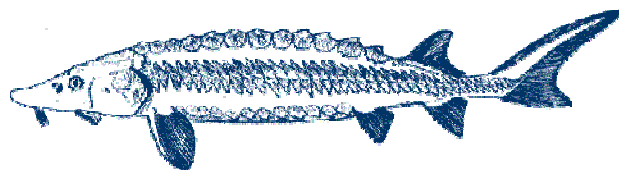
Familia Acipenseridae

Subfamilia Acipenserinae

Tribu Acipenserini

Género Acipenser

Especie ***Acipenser naccarii***



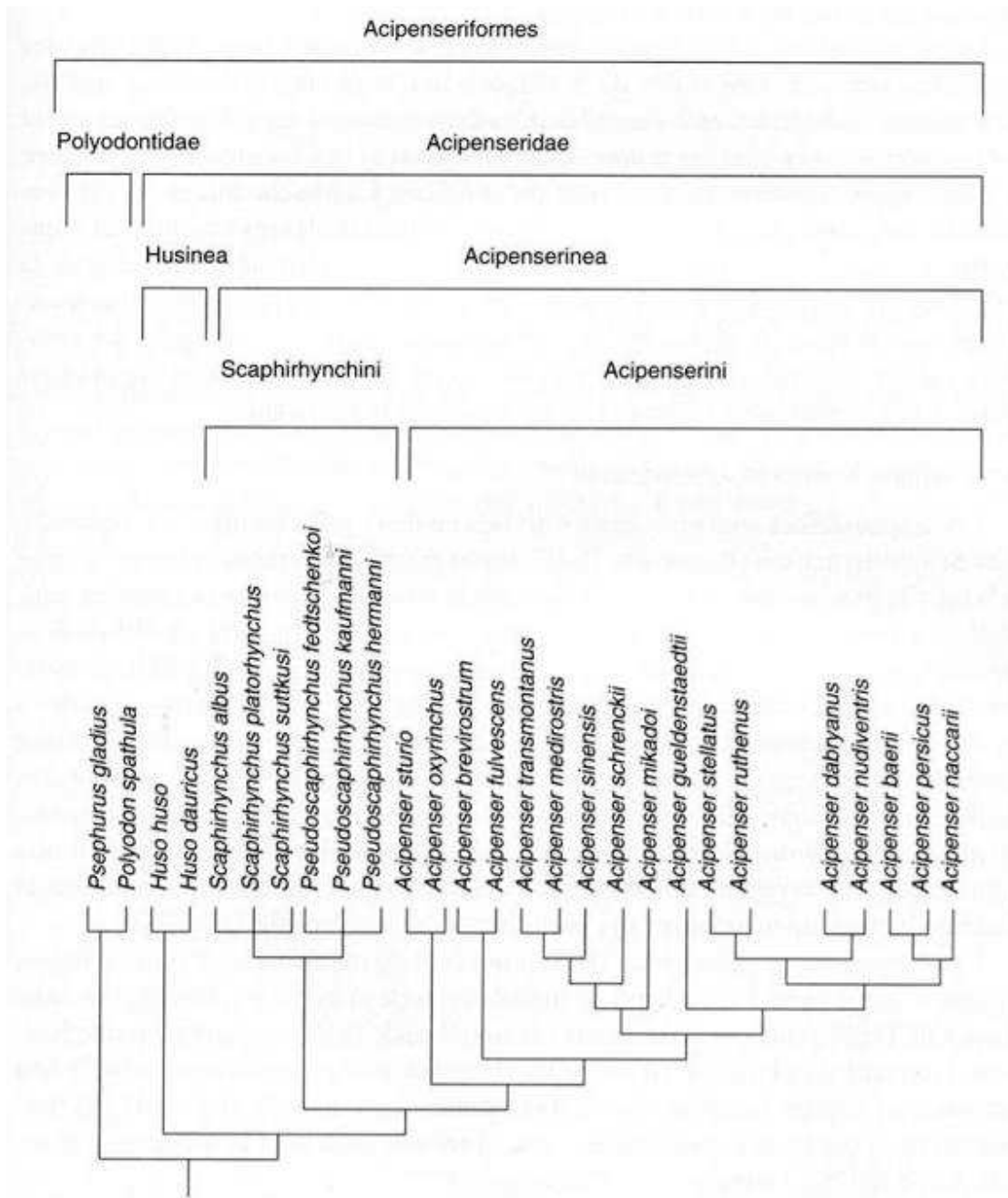


Figura 2. Árbol filogenético consensuado mostrando las relaciones entre los Acipenseriformes. (Según Bemis & Kynard (1997a) y Krieger et al., (2000)).

1.3 *Acipenser naccarii*, Bonaparte, 1836.

También conocido como sollo (España y Portugal), cobice o esturión del Adriático (Italia), o pez rey (Portugal). Etimológicamente el epígrafe específico *naccarii*, está derivado del nombre de F.L. Naccarii (1793-1860), un naturalista Italiano y estudiante de la fauna del Adriático a principios del s. XIX.

Algunos autores italianos que escribieron sobre el Mar Adriático, (Naccari, 1822; Nardo, 1827), denominaron *Acipenser huso* (= *Huso huso*) a una especie que poco más tarde, en 1836, fue distinguida por Bonaparte y llamada *A. naccarii*. Bonaparte envió un espécimen joven a Fitzinger quién informó junto a Heckel (Fitzinger & Heckel, 1836), que esta especie era nueva, llamándola *A. heckeli*. Más tarde, Heckel (1851), describe dos nuevas especies: *A. nardoi* y *A. nasus* supuestamente distintas de *A. naccarii* por las diferencias de tamaño y la variación en el número de placas dérmicas sobre la cabeza. Más tarde, estas características se consideraron como variaciones individuales y así lo aceptaron todos los ictiólogos, pasando *A. heckeli nardoy* y *A. nasus* a ser sinónimos de *A. naccarii*. Finalmente se utilizó el nombre de *naccarii* al considerarse bien establecido y es el que se ha empleado desde hace más de un siglo. Es interesante destacar la nota de Golowatschhoff (1857) sobre el tratamiento de *A. heckeli* como sinónimo de *A. naccarii*. En 1904, Berg, sin embargo, sólo menciona el nombre de *A. naccarii* Berg (1904). De acuerdo con la descripción dada para esta especie en 1989 por Vlasenko y colaboradores (Vlasenko *et al.*, 1989), pudo ser, sin embargo, una subespecie de *A. gueldenstaedtii*, ya que sus patrones cariotípicos parecen similares. A pesar de la estrecha relación entre *Acipenser gueldenstaedtii* (Brand, 1833) y *A. naccarii*, ambos difieren en coloración, y además, la primera tiene la cabeza y el morro más corto y un mayor número de branquiespinas que *A. naccarii*. No se conocen híbridos entre ambas especies ni subespecies de ninguna de ellas.

1.3.1. Biología

En cuanto a su biología, es un esturión diádromo de mediano tamaño, alcanzando un tamaño máximo de 200 cm de TL y 60 Kg de peso, aunque normalmente es más pequeño. Los machos suelen ser más pequeños pero, al igual que en las otras especies, no hay dimorfismo sexual (no se aprecian diferencias morfológica entre machos y hembras). Se desconoce su longevidad, que según distintos autores podría ser de 30 a 80 años y también su crecimiento. Se alimenta de invertebrados bentónicos, así como de restos animales, vegetales y semillas, (Soriguer *et al.*, 1999; 2002 y 2003). No es capaz de depredar sobre peces y otros animales con capacidad de fuga. Es una especie rara y poco conocida.

Reproducción

Su vida se reparte entre el mar y los ríos, a los que acude para reproducirse en primavera y verano. Deposita sus huevos en zonas de aguas limpias, sometidas a la influencia de las corrientes, y con fondos de arena y piedras. Es un pez lento, que pasa la mayor parte del tiempo escarbando los fondos en busca de comida. No existe mucha información sobre maduración, gónadas y puesta. En la naturaleza cada hembra suele estar acompañada durante el cortejo por un número entre 3 y 5 machos que cubren con su esperma los óvulos (Domezain, 2003). La reproducción suele realizarse durante la primavera en zonas profundas de entre 2 y 6 m, con fondo de grava y bien aireadas.

Migraciones

Habitualmente remontaban los ríos entre febrero y mayo, depositando los huevos en pozas profundas, con fondo de grava, situadas en distintos puntos del cauce. La migración aguas arriba dentro de los ríos italianos ocurre durante el primer mes del año (Canestrini, 1866). Permanecen en agua dulce hasta Octubre (De Betta, 1862). En España vivían en el Ebro y Guadalquivir. En este último, durante más de 30 años, existió una fábrica de caviar en Coria del Río (Sevilla), pero se cerró debido a la falta de capturas de ejemplares salvajes. Según Classen (1936; 1944), la época de entrada de los esturiones en el río comenzaba en enero, aunque de forma insignificante, aumentando progresivamente hasta llegar al máximo, que se situaba entre mediados de febrero y finales de abril. A partir de esta fecha disminuían las entradas, hasta que a mediados de mayo, finalizaba el periodo de inmigración.

Ecología y hábitat

A. naccarii es una especie diádroma, con puesta en agua dulce después de un periodo marino de crecimiento. Como las características biológicas y la dinámica de poblaciones de esta especie nunca se han investigado, virtualmente no se conoce su ecología. Durante su permanencia en el mar, no entra en aguas pelágicas pero permanece cerca de la plataforma continental, en la desembocadura de los ríos. Prefiere profundidades de entre 10 y 40 m sobre fondos arenosos o fangosos, (Paccagnella, 1948). Respecto a esto, también, *A. naccarii* tiene fuertes semejanzas con *A. gueldenstaedtii*.

Cariotipo

Los huevos son diploides, $2n \sim 240$ (239 ± 7) incluyendo 78 microsomas (Fontana & Colombo, 1974; Fontana, 1976). Estos mismos autores encontraron que la cantidad de DNA es 6.26 pg, mayor que en otros Acipenséridos, y que el DNA de *A. naccarii* está compartido con *A. gueldenstaedtii*, por lo que probablemente existiría una estrecha relación taxonómica entre estas especies (Robles *et al.*, 2004).

1.3.2. Distribución geográfica

Según Bonaparte (1836), *A. naccarii* se encontraba exclusivamente en el sur de Europa, y estaba aparentemente restringida al mar Adriático (Figura 3). Según esto, era un pez diádromo que habitaba sólo aguas dulces en el Norte de Italia y los países que bordean el Este del Adriático, desde la zona Norte (Venecia, Trieste) a Grecia y Corfú en el Sur.

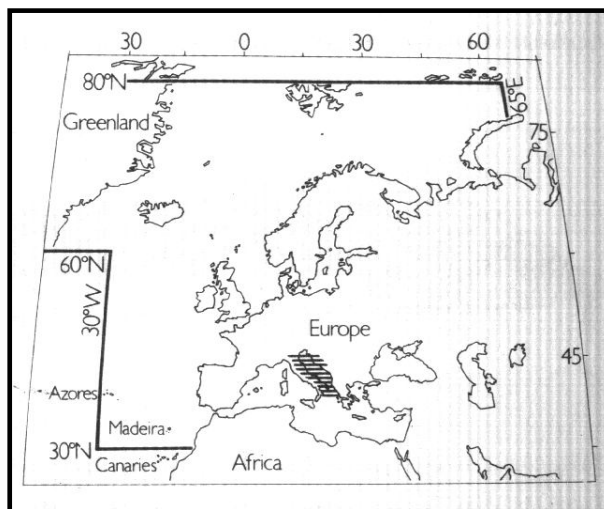


Figura 3. Distribución antigua de *A. naccarii* de acuerdo a Bonaparte, 1836.

En Italia, era conocida por ser escasa en algunas zonas, ahora lo es por todas partes, incluso en áreas donde había sido abundante en el pasado. Se informó de su presencia en varios ríos de Venecia: el Adige, el Brenta, Bracckiglione, Livenza, Piave, y Tagliamento. Ahora existe en el Po, cerca de Carozo, entre Cremona y Piacenza. En el Oeste de Piacenza fue el esturión más común.

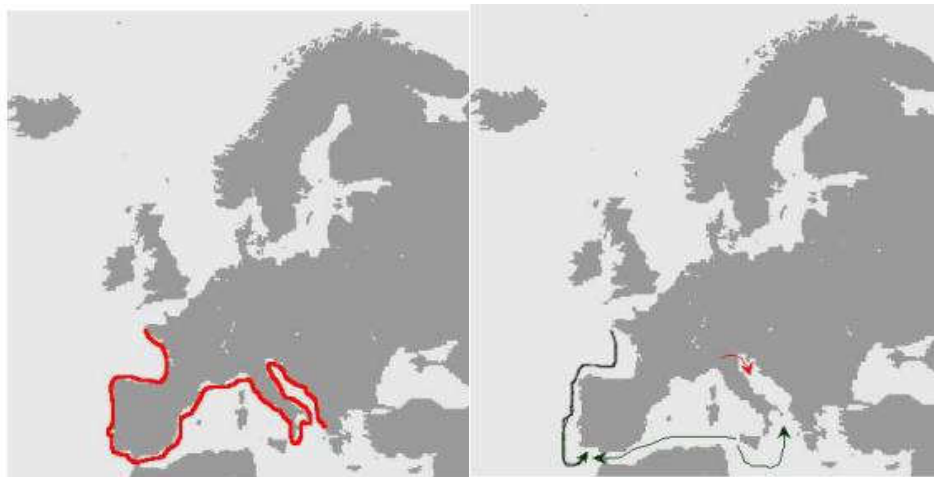
Durante el siglo pasado, *A. sturio* y *A. naccarii* tuvieron migraciones dentro del Predont, no muy lejos de Turín (Festa, 1892), aunque ahora han desaparecido de esta zona. Se han encontrado algunos ejemplares de *A. naccarii* cerca de la desembocadura del Po y en las localidades del oeste de Italia, tales como el río Arno y Florencia (Canestrini, 1861) y en el Golfo de Génova (Giglioli, 1880), aunque ya era muy escaso.

En otros lugares, como Yugoslavia, se carece de información detallada de la distribución de *A. naccarii* (especialmente en los ríos Cetina y Neretra en Dalmatia). Fue descrita como habitante del lago Skadar (Taler, 1954; Dream, 1957), y también se mencionó su existencia a lo largo de la costa albanesa (Ivanovic, 1973; Poljakov *et al.*, 1958). Berg (1932) la describió cerca de la isla de Corfú siendo más tarde incluido en la lista de peces encontrados en Grecia (Ondrias, 1971; Economidis, 1972). Este último también informó de que a lo largo de las costas de NW de Grecia era dudosa.

Ya se ha demostrado (Garrido-Ramos *et al.*, 1997) que *A. naccarii* es autóctono de la Península Ibérica. También Hernando y colaboradores (Hernando *et al.*, 1999), recopilaron citas antiguas desde principios del siglo XIX (Anónimo, 1818; Machado, 1857; Capello, 1869; 1880; Osorio, 1894; Seabra, 1911; Nobre, 1931; 1935; Gonçalves, 1942; Helling, 1943; Albuquerque, 1956 hasta Bauchot, 1987) que ya lo situaban en la Península y propusieron su nueva área de distribución desde el Porto (Norte de Portugal) al Adriático

(Hernando *et al.*, 1999 a y b) y posteriormente amplían su distribución en el atlántico francés hasta la Gironde (Hernando *et al.*, 2001). Más recientemente estudios genéticos han demostrado que *A. naccarii* y *A. sturio* coexistieron desde el Mar Adriático hasta la Península Ibérica (Robles, 2003; Robles *et al.*, 2004; Herrán *et al.*, 2002; Hernando *et al.*, 2008), entre otros. (Figuras 4 y 5).

A. naccarii



Figuras 4 y 5. Distribución histórica de *A. naccarii*
Regresión y recolonización por restauración del stock

1.3.3. Características que lo diferencian de otros Acipenséridos

Basándonos en las descripciones y estudios morfométricos de una serie de autores (Soljan, 1975; Svetovidov, 1984; Holcik 1989 a y b; Sokolov, 1989; Tortonese, 1989 & Domezain, 2003), estas son las características que diferencian a *A. naccarii* de otros Acipenséridos:

- Boca transversa, relativamente grande y ligeramente curva en los extremos; la anchura interna máxima de la boca no cabe dos veces entre ésta y la punta del hocico.
- El hocico es corto y con el extremo redondeado y su longitud no supera un tercio de la longitud del cuerpo.
- El labio inferior es continuo con una acanaladura en el centro.
- Poseen cinco filas de escudetes:
 - dorsales: entre 10 y 14 escudetes (los de la zona media son más profundos y generalmente más grandes que los de la parte frontal).
 - laterales: el número de escudetes varía de 32 a 42 en cada lado
 - ventrales: entre 8 y 11 escudetes en cada flanco, sin placas más pequeñas entre las filas dorsales y laterales

- La aleta dorsal tiene entre 36 y 48 radios mientras que la anal varía de los 24 a los 31.
- La parte posterior del cuerpo es marrón-oliváceo, los flancos más claros y la parte ventral blanquecina.

1.4 Desarrollo

1.4.1. Breve reseña histórica

La mayoría de las especies de esturiones no eran importantes fuera de la antigua URSS. Prácticamente toda la industria pesquera de esturiones estaba concentrada dentro de este territorio debido a la abundancia de los mismos en las aguas de sus mares (Caspio, Negro y Azov). El agotamiento de las reservas en Europa Occidental y Norteamérica, con el subsiguiente cierre de su industria pesquera, fue uno de los motivos por los que aumentó la presión de explotación sobre las poblaciones soviéticas.

Los programas de investigación sobre la biología del desarrollo del esturión en la antigua URSS, fueron pioneros y motivados por la necesidad de establecer criaderos para mantener sus stocks de esturiones.

Esta necesidad surgió entre 1930 y 1940 debido a la construcción de presas en los ríos, que estaban afectando a los lugares de puestas de estas especies, ya que bloqueaban las rutas para el desove y estaban provocando el cambio de áreas para las distintas especies de esturiones, entre ellas las que económicamente eran más importantes: esturión ruso (*A. gueldenstedtii*), estrellado (*A. stellatus*) y gigante (*Huso huso*). Los esfuerzos de las autoridades gubernamentales para minimizar los efectos de estas construcciones no se hicieron esperar y se enfocaron hacia la regulación de la industria pesquera y el desarrollo de grandes criaderos para producir un número suficiente de progenitores para programas de recuperación eficaces.

Se desarrollaron métodos para la inyección de un extracto de glándula pituitaria (hipófisis) para inducir la maduración de gametos, ovulación, y espermiación en esturiones capturados en los estuarios (Gerbil'skii 1941, 1947, 1949; Persov, 1941; Votinov, 1947; Kazanskii, 1951, 1952, 1953a, b; Barannikova, 1954), que condujeron a logros importantes especialmente en la reproducción controlada en acuicultura.

Al mismo tiempo, Derzhavin (1947) logra la puesta natural de esturión ruso en tanques circulares en condiciones similares a las ya conocidas de los lugares de puesta (por ejemplo, velocidad de la corriente, sustrato de puesta y presencia de otros esturiones).

Antes de 1950, los huevos de esturión se incubaban en jaulas sumergidas en el río (incubadoras de Seth Green). A principios de los años 1950, P.S. Yuschenko diseñó el primer aparato para la incubación de huevos de esturión en suspensión, después del tratamiento con lógamo para evitar la adherencia. Este supuesto "tambor (bidón) incubador" se probó en la orilla para estudiar los efectos de la técnica de incubación sobre el desarrollo y la supervivencia de los huevos y embriones hasta la eclosión (Vernidub, 1951, 1952; Vernidub & Kiseleva, 1953).

Los estudios con los esturiones estrellado y ruso continuaron en 1950, realizándose la incubación de los embriones en los lugares que se consideraban más idóneos. El desarrollo de técnicas que fuesen prácticas y eficaces, así como la construcción de los criaderos planificados para la incubación de los huevos resultaron complicados.

Estos estudios cesaron más tarde, pero gracias a ellos se produjeron las primeras publicaciones fundamentales para la biología del desarrollo y el cultivo de esturiones.

1.4.2. Embriología

Desde tiempos muy antiguos se ha ido obteniendo información parcial sobre el desarrollo de los animales. Ya Aristóteles, en el año 340 a.C., realiza la descripción del desarrollo del embrión de pollo en el huevo. Posteriormente, en los siglos XVII y XVIII, se realizaron observaciones sobre el desarrollo de muchos animales, en especial insectos y vertebrados (Balinsky, 1983). Pero los datos de embriología se presentaron por primera vez en forma coherente por Karl Ernst Von Baer (1828). Baer no sólo recopiló los datos existentes, complementándolos con observaciones originales suyas, sino que realizó también importantes generalizaciones. La más importante de éstas se conoce como Ley de Baer: *“Los rasgos más generales que son comunes a todos los miembros de un grupo de animales, se desarrollan en el embrión antes que los rasgos más especiales, que distinguen a los diversos miembros del grupo”*, es decir, los caracteres que distinguen a las familias, géneros y especies aparecen después en el desarrollo de los individuos. Según la ley de Baer, los rasgos comunes de los grandes grupos de animales son los primeros en desarrollarse durante la ontogenia. Estos rasgos son los que se heredan del antepasado del grupo animal en cuestión: tienen un origen antiguo. Los rasgos que distinguen a los diversos grupos de animales entre sí son los que han adquirido posteriormente en el curso de su evolución. La ley de Baer (también denominada más tarde ley biogénica de Müller-Haeckel tras formularse la teoría de la evolución) afirma que estos rasgos se desarrollan en la ontogenia, en fases más avanzadas. En resumen, los rasgos de origen antiguo son los primeros en desarrollarse en la ontogenia mientras, que los de origen más reciente se

desarrollan más tarde. El desarrollo ontogénico presenta los distintos rasgos de la organización del animal en la misma secuencia en que éstos evolucionaron durante el desarrollo filogénico. La ontogenia es una recapitulación de la filogenia. El embrión debe adaptarse al ambiente que le rodea y estas adaptaciones necesitan, a menudo, la modificación de los rasgos de organización heredados; además, como resultado de la adaptación a condiciones muy especiales, se adquieren profundas modificaciones.

El conocimiento del desarrollo embrionario ha contribuido profundamente al desarrollo de la biología evolutiva. Los estudios sobre biología del desarrollo de los esturiones, peces únicos filogenéticamente, han proporcionado y proporcionan ideas para el desarrollo eficaz y las exigencias de las diferentes especies, fertilización, incubación de huevos y métodos de cría de embriones.

1.4.3. Embriogénesis de los esturiones

Aunque el desarrollo embrionario es un proceso continuo, se reconocen diferentes estados para seguir el curso de los acontecimientos y comparar los procesos del desarrollo entre los diferentes grupos. El estado más joven del embrión es el huevo fecundado, o cigoto, que se desarrolla posteriormente a los estados de mórula, blástula, gástrula y neúrla.

Durante estos primeros estados del desarrollo, el área embrionaria se diferencia del área extraembrionaria, que soporta al embrión o lleva los nutrientes, sin que ésta sea una parte del propio embrión. El embrión se organiza primero en las capas germinales básicas, y luego pasa por la organogénesis (formación de los órganos); durante este proceso las capas germinales, bien constituidas, se diferencian en órganos específicos.

Los procesos que conducen al desarrollo de un nuevo individuo en realidad empiezan antes de la fecundación del óvulo. La fase de gametogénesis (formación de los gametos, células haploides) crea las condiciones a partir de las cuales se inicia la embriogénesis.

Fecundación

El desarrollo comienza con la fecundación, es decir, la fusión de los gametos (células sexuales): un gameto femenino, óvulo y otro masculino (espermatozoide), seguida por la unión de los núcleos de ambos gametos. Los espermatozoides deben llegar a la proximidad del óvulo. Esto requiere diferentes adaptaciones de los progenitores como son las descargas de células sexuales simultáneamente (fecundación externa) o mediante cópula en los casos de fecundación interna. Los espermatozoides deben encontrar el óvulo y

penetrar en el citoplasma lo que conlleva una serie de reacciones morfológicas y fisicoquímicas. Cuando el óvulo es fecundado por el espermatozoide, comienza a dividirse.

El tipo de embriogénesis y el desarrollo embrionario de los esturiones está influenciado por la temperatura y depende muy directamente de ésta (Hardy & Litvak, 2004, Van Eenennaam *et al.* 1996; 2005; Wang *et al.* 1985, 1987). Cuando las temperaturas de incubación son más elevadas se reduce el tiempo requerido para el desarrollo, aunque cada especie tiene diferentes tolerancias y un rango de temperaturas óptimo en el que hay mayor supervivencia. (Van Eenennaam *et al.*, 2005)

La mayoría de los esturiones se reproducen dentro del rango de temperaturas de los 10-20 °C, incluyendo al euroasiático (Dettlaff *et al.*, 1993) y al norteamericano (McCabe & Tracy, 1994; Bruch & Binkowski, 2002; Perrin *et al.*, 2003). El rango de temperaturas que permite el desarrollo normal es crítico en la reproducción de los esturiones al igual que en otros peces.

En este periodo, el huevo fertilizado es una sola célula en la que se produce una repetida división celular mitótica. El cigoto debe dar lugar a un gran número de células, para que se desarrolle un organismo complejo y pluricelular. El tamaño del huevo no cambia, por lo que las células originadas por las sucesivas divisiones (blastómeros) son cada vez más pequeñas. El resultado final de todo este proceso de segmentación es una masa compacta de células, la blástula, constituida por una capa de células, el blastodermo, rodeando a una cavidad, el blastocele. En todos los grupos de cordados la segmentación convierte al cigoto unicelular en una blástula hueca, multicelular. Las variaciones que existen en el proceso básico de la segmentación son consecuencia de las diferencias que hay en las reservas de vitelo acumulado.

Periodos de segmentación y blastulación

La segmentación de los esturiones es holoblástica, lo que conlleva la formación de una blástula esférica, pequeña y excéntrica, debido a que los surcos mitóticos en el polo vegetativo se desarrollan más lentamente que en el polo animal, aunque estos surcos mitóticos pasan sucesivamente a lo largo de todo el cigoto, desde el polo animal al vegetativo.

El periodo de segmentación se continúa con un periodo de blastulación que está caracterizado por la disminución de divisiones nucleares, ralentizándose el ciclo mitótico, y realizándose la función morfogenética nuclear.

La posición de los surcos de división (o segmentación) en los huevos del esturión sigue estrictamente el patrón de Hertwing, de acuerdo al cual los ejes del huso están

orientados en la dirección de la máxima longitud del citoplasma libre de inclusiones, (Dettlaff *et al.*, 1993).

Periodo de Gastrulación

En esta fase, el embrión adquiere un aspecto característico, dando lugar a la gástrula. La única capa de células, el blastodermo, da origen a las tres capas germinales. Éstas son complejos esbozos a partir de los cuales se forman los diversos órganos del cuerpo del animal. Todos los tejidos y órganos provienen de estas tres capas de células: el ectodermo o capa externa, el endodermo o capa interna y la capa intermedia, entre las dos anteriores, el mesodermo. Este desplazamiento de partes del blastodermo, que al final se reordenan en la forma de un sistema de capas concéntricas de células, es la esencia del proceso de la gastrulación. Durante este proceso el material embriogénico adquiere la localización correspondiente al plano del cuerpo del adulto. Las interacciones entre posiciones muy cercanas de las partes del embrión determinan la dirección de su desarrollo posterior (Dettlaff *et al.*, 1993).

Los rasgos más notables de la *gastrulación* serían los siguientes:

1. Reordenación de las células del embrión por medio de los movimientos morfogenéticos.
2. Disminución del ritmo de las divisiones celulares.
3. El crecimiento, si es que existe, es insignificante.
4. Aumenta la actividad de los núcleos para controlar las actividades de las células embrionarias.
5. La influencia de los cromosomas paternos se hace patente durante la gastrulación.
6. Se empieza a sintetizar proteínas de muchos tipos nuevos, que no se hallaban presentes en el huevo.

El final de la gastrulación y el comienzo de la neurulación es también un momento crítico del desarrollo.

Neurulación

La neurulación, comienza cuando los labios laterales del blastoporo convergen y, simultáneamente, el tapón de vitelo desaparece en una depresión. Este periodo se caracteriza por la existencia de procesos de organogénesis muy intensos. Además, aparecen los rudimentos de los principales sistemas orgánicos (nervioso, muscular, circulatorio, excretor, digestivo), periodo de organogénesis, aunque estos órganos todavía no son funcionales. Al principio, el embrión no se mueve, se alimenta de las reservas de su saco vitelino, y respira por toda la superficie de su cuerpo (Carlson, 2000).

En el inicio de este período, el material de las capas germinales se divide sobre los rudimentos de los sistemas individuales de los órganos. Los cambios más característicos en el aspecto externo del embrión en esta etapa consisten en la formación de una placa neural sobre el lado dorsal y su cierre en un tubo neural, un rudimento del sistema nervioso central (neurulación) (Balinsky, 1978, 1983).

El grado de linealidad de la región tronco-posterior y de la cola puede servir como un segundo criterio común para determinar la etapa del embrión durante este período. Este criterio se utiliza fundamentalmente en investigación, cuando es necesario determinar la etapa con mucha precisión, pues el embrión se puede liberar fácilmente de las membranas con una o dos pinzas de puntas finas. (Dettlaff *et al.*, 1993).

Eclosión

La eclosión ocurre cuando de forma natural, el embrión perfora y queda libre de las membranas del huevo, generalmente es la cola la primera estructura que se libera aunque no siempre es así. Cuando el embrión se libera de las membranas, la parte del tronco se expande y la cola se agita fuertemente.

Las investigaciones sobre el desarrollo embrionario se iniciaron en los años 1950 por un grupo de científicos, Schmalhausen, Dragomirov, Disler, y Baburina, que estudiaron el desarrollo de los sistemas respiratorio, circulatorio, digestivo, y sensorial en los esturiones estrellado (*Acipenser stellatus*), ruso (*Acipenser gueldenstaedti*) y el esturión de morro corto (*Acipenser brevirostrum*) del río Amu Darya.

En los años 60, se utilizó el cultivo *in vitro* en laboratorio para estudiar la maduración de folículos ováricos en anfibios (Dettlaff *et al.*, 1964; Dettlaff, 1966). Los métodos *in vitro* también se han aplicado a esturiones (Skoblina, 1968, 1969; Dettlaff & Skoblina, 1969; Goncharov, 1969a,b, 1972, 1976,1978). Estos estudios generaron una nueva riqueza de información sobre los mecanismos fisiológicos de maduración de los ovocitos así como un ensayo biológico para predecir la respuesta de la ovulación de esturión tratado por glándula pituitaria femenina (Goncharov, 2002).

Mediante estudios, tanto *in vitro* como *in vivo*, se observó que la temperatura controla la maduración y la ovulación y, de manera similar, controla el desarrollo del embrión (Dettlaff & Zubova, 1962). Se desarrollaron los gráficos para mostrar la relación de la temperatura con el tiempo de ovulación en los esturiones estrellado, ruso y gigante (Dettlaff *et al.*, 1965).

Posteriormente se obtuvo información adicional a estos estudios realizando observaciones en el criadero de esturiones de Volgogrado (Igumnova, 1974, 1975, 1985). En estudios realizados en el criadero de esturiones de Rogozhkiño, en el Río Don, Dettlaff y

Goroshov registraron el tiempo de ovulación, la fecundidad de criadero, los porcentajes de fertilización normales y poliespérmicos, y las mortalidades de eclosión para huevos procedentes de diferentes hembras (Dettlaff & Goroshov, 2002).

En la primera información sobre embriología del esturión Kowalewsky *et al.*, (1870), describieron el desarrollo de embriones y embriones de vida libre de *A. ruthenus*. Estas observaciones se continuaron más tarde por Salensky (Salensky, 1878, 1880, 1881). Los estudios de embriología más recientes, centrados en el desarrollo de órganos individuales, se han realizado fundamentalmente sobre *A. ruthenus*. Sin embargo, para la mayoría de los científicos, los estudios del desarrollo de esturión son interesantes desde el punto de vista de la comparación embriológica.

Los estudios de desarrollo de esturiones son también importantes para realizar pruebas y poner a punto diferentes métodos y técnicas en acuicultura. Estos estudios incluyen investigaciones en mecanismos de maduración de oocitos, fertilización, desarrollo de embriones y embriones de vida libre, defectos embriogénicos y del desarrollo de los embriones de vida libre, etc.

Schmalhausen describió diez etapas del embrión (etapas 36 – 45), desde la eclosión hasta el inicio de la alimentación exógena (*embrión de vida libre*) en los esturiones estrellado, ruso y gigante (*Huso huso*), incluyendo el diagnóstico de sus características y los porcentajes de desarrollo [en horas y unidades τ_0 , (duración de un ciclo mitótico)]. También proporcionó los dibujos detallados y exactos de las etapas normales y de muchos defectos del desarrollo (Schmalhausen, 1968, 1975). Esta información se incluyó posteriormente en las tablas de desarrollo normales para los tres esturiones anteriormente citados (Dettlaff *et al.*, 1981).

Más tarde, (Dettlaff *et al.*, 1993), fueron identificados 35 estadios sucesivos de desarrollo embrionario. Estos fueron descritos primero para *A. stellatus*, e ilustrados con fotografías de embriones de otras especies. Estos autores recopilaron información anterior para embriones de *A. gueldenstaedti* (Dettlaff & Ginsburg, 1954) y de los estadios descritos posteriormente para *A. g. colchicus* y comparados con algunos estadios de *H. huso*, (Schmalhausen, 1991; Dettlaff *et al.*, 1981), así como las ilustraciones publicadas parcialmente (Ginsburg & Dettlaff, 1975, Dettlaff *et al.*, 1981).

Los estudios realizados por Dettlaff y colaboradores (Dettlaff *et al.*, 1993), se llevaron a cabo fundamentalmente sobre *A. gueldenstaedti*, *A. g. colchicus*, *A. stellatus* y *H. huso*, añadiendo el desarrollo de *A. ruthenus* y de los embriones de vida libre de *Pseudoscaphirhynchus kaufmanni*, así mismo, en aquellas especies que despiertan interés económico desde hace tiempo, como el esturión siberiano *Acipenser baeri* (Gisbert *et al.*,

1998, 1999), o el blanco, *Acipenser transmontanus* (Buddington & Doroshov, 1986; Dettlaff *et al.*, 1993; Gawlicka *et al.*, 1995).

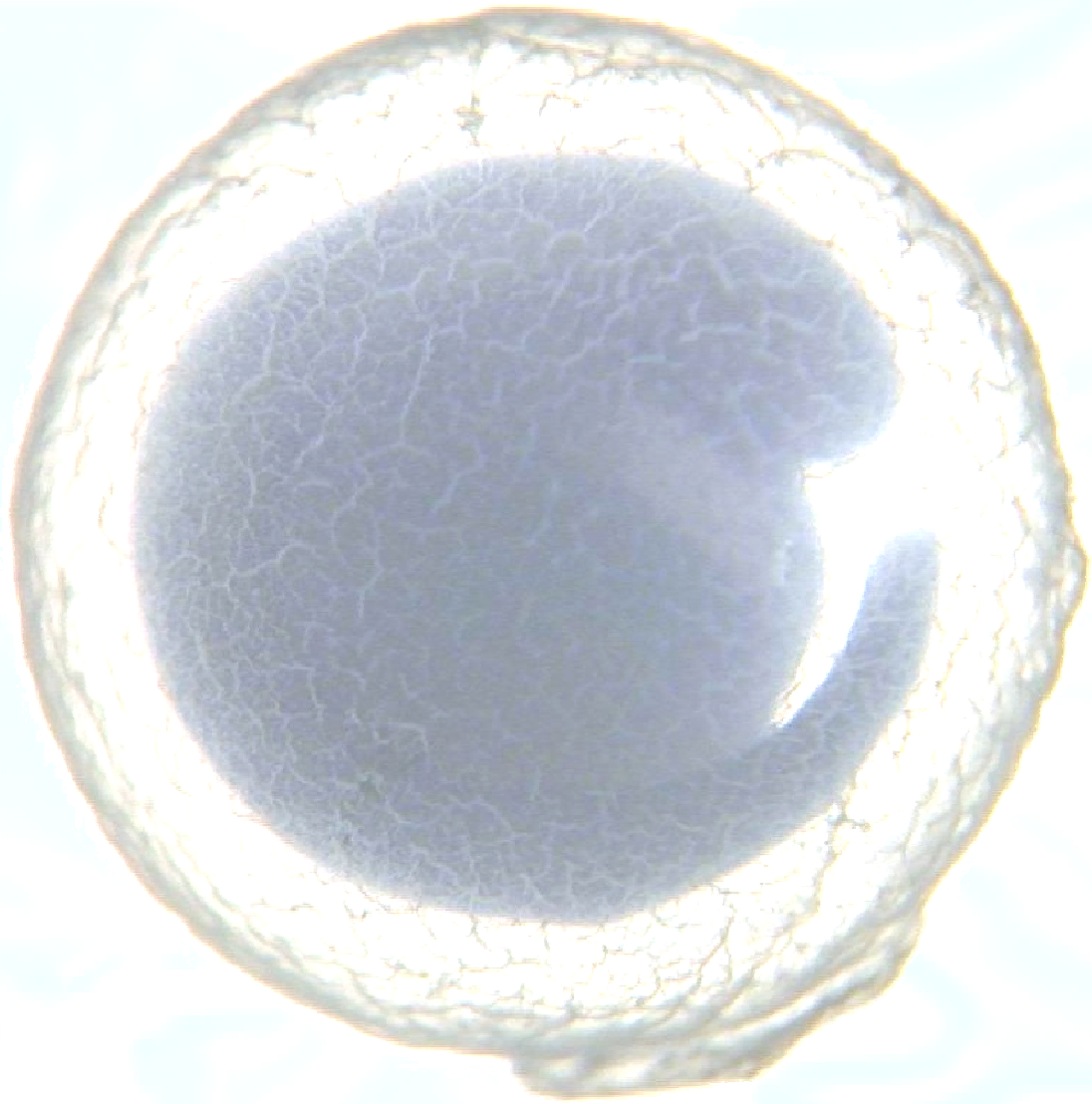
Respecto al desarrollo embrionario del esturión ruso y otros Acipenséridos (Dettlaff *et al.*, 1993), hay abundante información. Sin embargo, es más limitada en las etapas de su vida previas a la alimentación exógena (*periodo de embrión*). Las etapas tempranas del desarrollo son probablemente las más importantes y complejas en el desarrollo de los esturiones, dadas las rápidas y numerosas transformaciones y adaptaciones que tienen lugar (Dettlaff *et al.*, 1993).

La revisión realizada por Dettlaff y colaboradores (Dettlaff *et al.*, 1993) sobre el estado de la biología de los esturiones en Rusia, facilitó la disponibilidad de dichos estudios biológicos sobre esturiones y más tarde contribuiría al desarrollo de la acuicultura en distintas partes del mundo.

Diferentes autores han defendido la similitud de los patrones de desarrollo a lo largo del grupo de los Acipenseriformes (Buddington & Christofferson, 1985; Buddington & Doroshov, 1986b; Dettlaff, 1993; Gawlicka *et al.*, 1995; Gisbert *et al.*, 1998) por lo que pueden establecerse unas directrices capaces de resumir, al menos de forma general, el desarrollo de los embriones de esturión.

En el desarrollo de los embriones de vida libre de esturión se identificó y caracterizó un considerable número de estructuras comunes. Sin embargo, existen muchas diferencias específicas durante este periodo que se incrementan con la edad para embriones de kaluga, *H. dauricus* (Schmalhausen, 1975) y beluga, *H. huso* (Dettlaff *et al.*, 1981).

En cuanto al número de huevos de *A. naccarii*, Domezain (Domezain, 2003), basándose en el trabajo de Classen (Classen, 1944), estima que cada hembra produce aproximadamente unos 600.000 óvulos por puesta, oscilando entre 370.000 (25 Kg de PT) y 1.258.000 (85 Kg de PT). El esfuerzo reproductor para *A. naccarii* está dentro de lo estimado para los esturiones (Billard, 2002), que dan resultados notables, ya que las gónadas en el macho suponen, cuando están maduras, entre el 9 y 10% de su peso corporal, y en las hembras entre el 10 y 30%. Classen (1944), estimó una media de 88 huevos por gramo de ovario maduro.



Capítulo 2. Material y métodos

2.1 Material biológico y zona de muestreo

2.1.1. Zona de muestreo

Se ha estudiado el desarrollo ontogénico desde la fecundación del huevo hasta los 3 meses de edad post-eclosión (pe) del esturión, *Acipenser naccarii*, (Bonaparte, 1836) en condiciones de piscifactoría. Los ejemplares provenían del criadero de la piscifactoría “Sierra Nevada”, que se encuentra ubicada en Loja (Granada) (Figura 6).

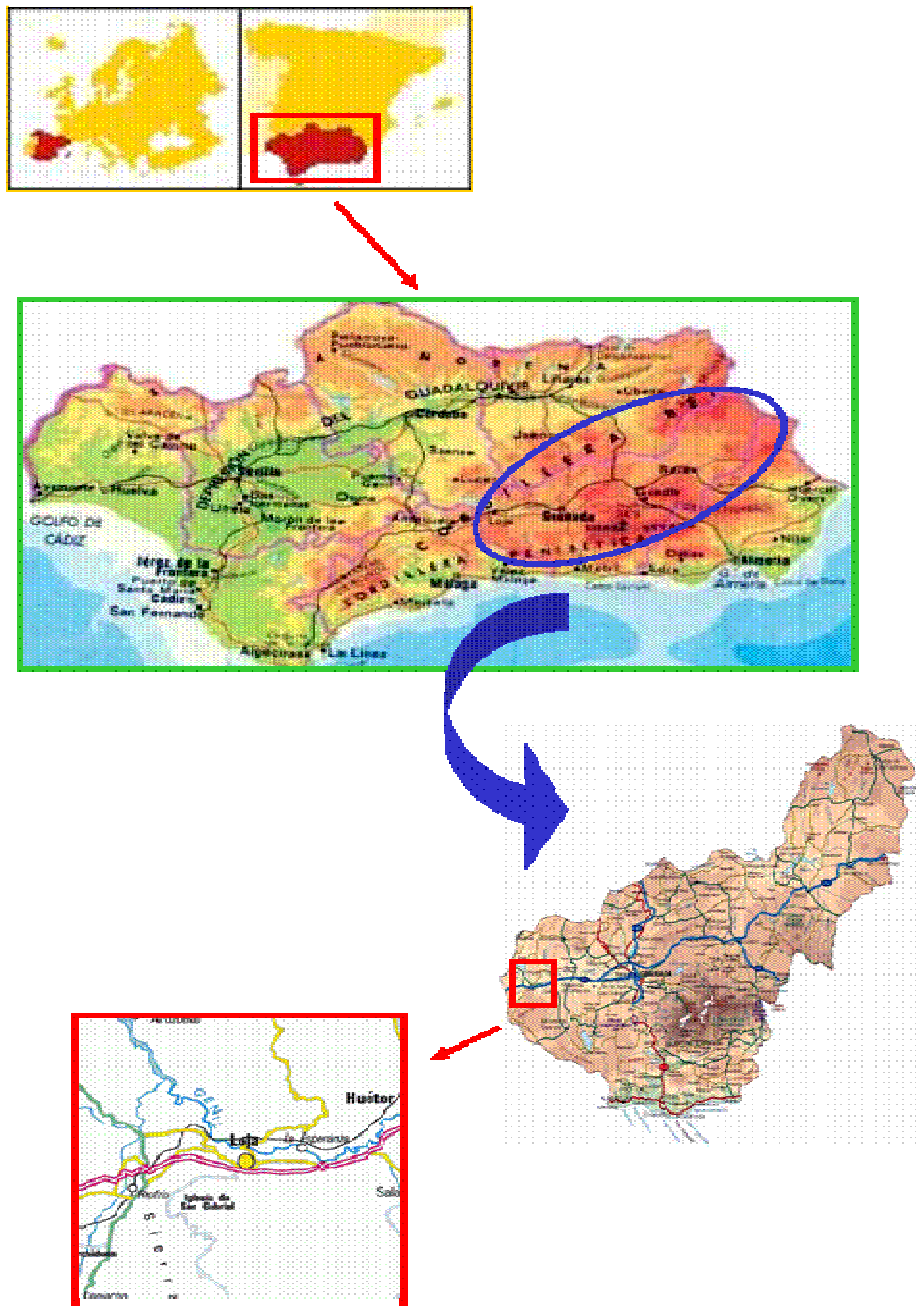


Figura 6. Localización del lugar de muestreo para huevos, embriones y alevines

2.1.2. Material biológico

Los huevos, embriones y alevines descendían de progenitores F2 de F1 criados y reproducidos en Riofrío (Granada), procedentes de parentales salvajes. Se tomaron diferentes ejemplares desde huevos (antes de la eclosión, post-fecundación, (pf)) hasta embriones y alevines post – eclosión (pe).

Los huevos fertilizados provenían de 3 hembras a las que se les indujo a la puesta con hipófisis de esturión. Se partió de 3 cohortes reproductivas. Las cohortes de junio de 2002 y junio de 2003 se incubaron a 15° C y la cohorte de julio de 2002 a 17 °C, regulándose la temperatura mediante intercambiadores de calor. Los huevos se incubaron en botellas de 5 litros de estructura mixta entre el tipo Zhoug y el tipo McDonalds, con circuito abierto. La densidad de incubación fue de 250 g por botella. No se añade oxígeno disuelto puesto que éste se mantiene de modo natural en 9 mg/L. La velocidad de la corriente de agua en las incubadoras se ajustó según las necesidades, siendo más lenta al principio e incrementándose posteriormente para reducir las infecciones por hongos. Los huevos muertos fueron retirados a través de pipeta con pera de plástico. Para evitar que los huevos se pegasen unos a otros y se formase una masa compacta que impidiese la oxigenación de los mismos y que pudiese llegar a ser un foco de infección de hongos, además de aumentar la aireación en las botellas de incubación, se utilizó caolín un producto que puede producir un color blanquecino a la membrana más externa del huevo (membrana gelatinosa rugosa).

Se utilizaron un par de pinzas para liberar a los embriones de las membranas, aunque también usó papel secante, ya que colocando los huevos sobre éste y dándoles un pequeño giro sobre sí, se rompen las membranas, y los embriones salen fácilmente. A continuación se colocaron sobre una placa Petri para su posterior observación bajo la lupa.

A partir de la eclosión los animales se trasladaron a piscinas de poliéster de 5 metros de longitud, donde se mantuvieron a 15° C, pH 7,4 +/- 0,3, sometidos a un fotoperiodo artificial 12/12.

Se realizó aporte de alimento vivo desde que el embrión inicia la alimentación exógena hasta los tres meses de edad. A partir de este momento se pasa a alimentación inerte (Figura 7).

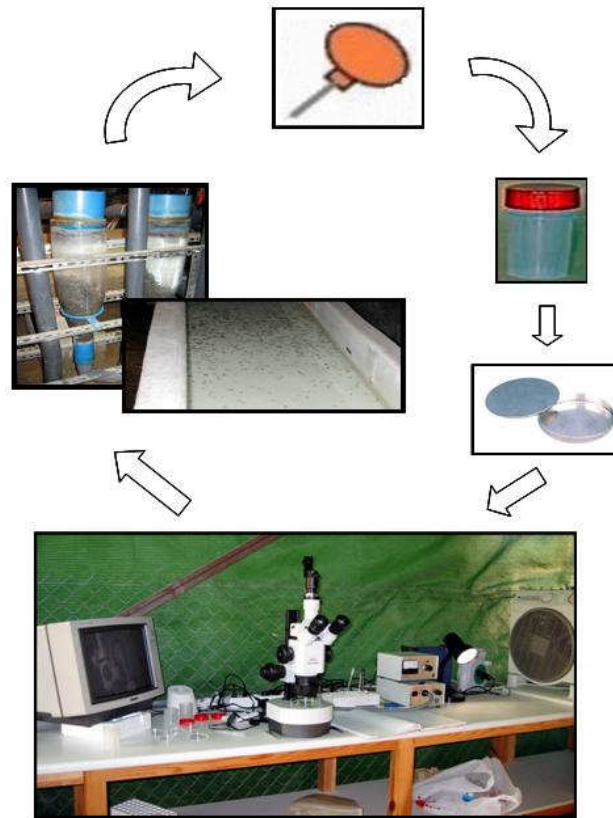


Figura 7. Proceso general de toma de muestras

2.1.3. Muestreos

Los muestreos tuvieron lugar en el periodo comprendido entre Junio de 2002 hasta Diciembre de 2003. La periodicidad de los muestreos se fue espaciando en el tiempo para adaptarlos a la velocidad de desarrollo (Tabla 1).

Tabla 1. Periodicidad de los muestreos durante el primer año

Toma de muestras	Duración	Horas	TIEMPO TOTAL		
			días	semanas	meses
Cada 20 '	12 primeras horas	12 h			
Cada 40 '	12 – 24 h	24 h	1 d		
Cada 60'	24 h	48 h	2 d		
Cada 2 h	24 h	72 h	3 d		
Cada 2 h	24 h	96 h	4 d		
Cada 3 h	24 h	120 h	5 d		
Cada 3 h	24 h	144 h	6 d		
Cada 3 h	24 h	168 h	7 d	1 sem	
Cada 6 h	168 horas (1 sem)	336 h	14 d	2 sem	
Cada 12 h	168 horas (1 sem)		21 d	3 sem	
Cada 24 h	168 horas (1 sem)		28 d	4 sem	1 mes
Cada 5 d	6 muestreos / mes				2 meses
Cada 15 d	2 muestreos / mes				3 meses

Durante el segundo año los muestreos fueron puntuales siguiendo el mismo procedimiento a lo largo de todo el periodo para asegurar la homogeneidad de los mismos.

Los ejemplares se fotografiaron en vivo, sin ningún tipo de conservante o técnica que deteriorase las proporciones naturales de las diferentes partes del cuerpo ya que es prioritario establecer el patrón de desarrollo normal. Sólo cuando los individuos presentaban una alta tasa de movilidad se añadía al agua unas gotas de formol para disminuir el movimiento y poder entonces fotografiarlos. Las fotografías se tomaron mediante una cámara digital Canon acoplada a un microscopio estereoscópico Leica MZ10 y las imágenes se almacenaron para su análisis posterior en CDROM, anotándose su numeración y correspondencia con el ejemplar, haciendo constar entre otros detalles el periodo a que correspondía el ejemplar y el tipo de conservación a la que posteriormente fue sometido. Los ejemplares se conservaron, debidamente etiquetados en formaldehído al 5%, liquido de Bovin y MAW.

Las imágenes obtenidas se transfirieron a la unidad de análisis y se inició el estudio informático y merístico de las mismas, mediante el programa de análisis de imágenes Leica Qwin®.

Para el estudio merístico de la región cefálica se han tomado las variables definidas en Soljan (1975) y Holcik (1989), (Tabla 2 y Figura 8). Además de las referidas a las aletas caudal, pectorales y saco vitelínico. (Figuras 9, 10 y 11). Se hicieron ajustando la escala correspondiente, realizando las medidas por triplicado y tomando el valor medio para minimizar el error de medida. Al mismo tiempo que se analizaban las imágenes, se inició la formación de la base de datos donde se almacenó junto a cada imagen todas las medidas tomadas. Se procedió al tratamiento de imágenes, análisis e interpretación de las mismas.

Tabla 2. Variables utilizadas en el análisis morfométricos y lugar donde están descritas

Variables	Autores
s - b	Holcik, 1989
b - mc	Holcik, 1989
s -mc	Holcik, 1989
lab	Soljan, 1975
IWM	Soljan, 1975
hl	Holcik, 1989
lb	Holcik, 1989

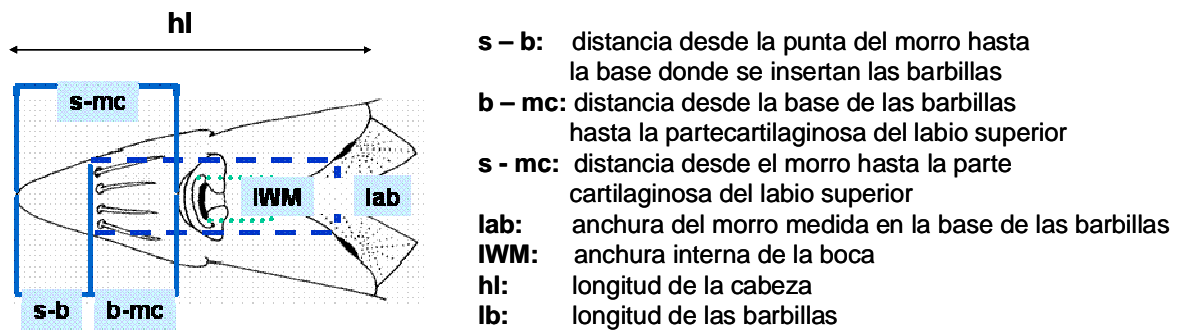


Figura 8. Medidas realizadas en la cabeza de *A. naccarii*

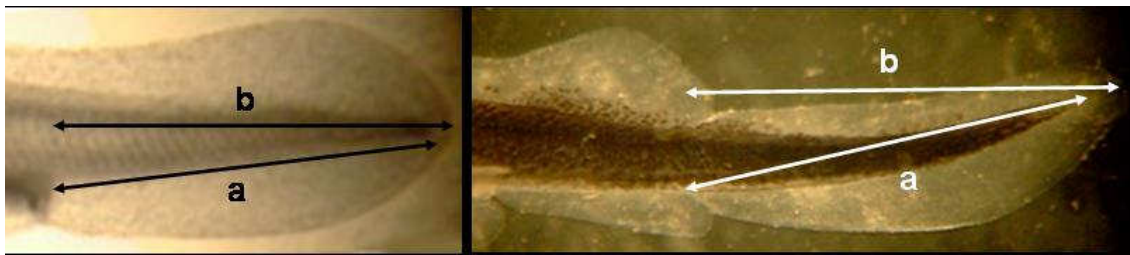


Figura 9. Medidas que se realizan sobre la aleta caudal

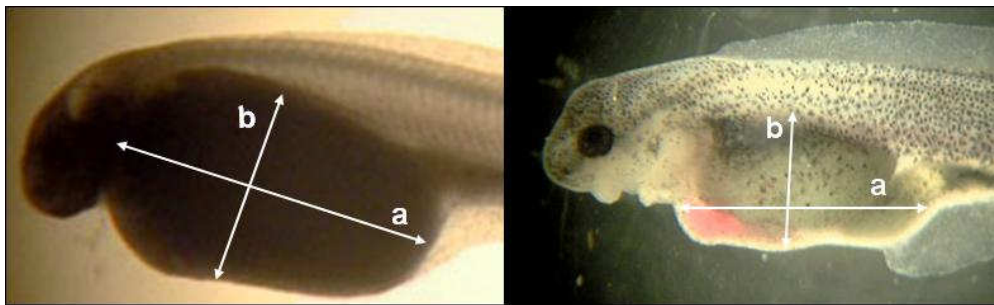


Figura 10. Medidas que se realizan sobre el saco vitelínico

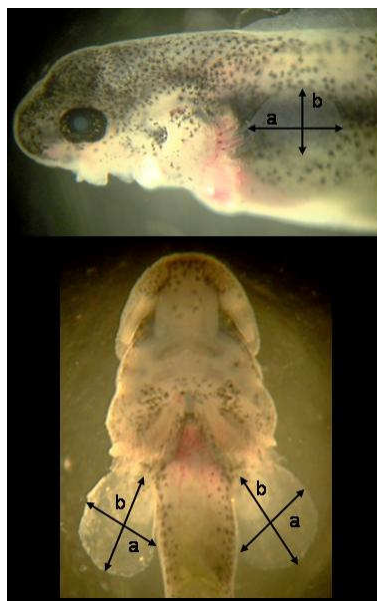


Figura 11. Medidas que se realizan sobre las aletas pectorales

2.2 Estudio y descripción de los especímenes

2.2.1. Nomenclatura utilizada

Los diferentes estadios por los que atraviesa un pez a lo largo de su desarrollo han recibido una gran cantidad de denominaciones, lo que ha generado una enorme controversia. Siguiendo los trabajos de (Balon, 1975; 1999) encontramos,

- especies con desarrollo indirecto que pasan por un periodo de metamorfosis, como la anguila y el lenguado.
- especies con desarrollo directo y que no sufren metamorfosis, como es el caso de los esturiones.

En este último grupo de especies pueden distinguirse una serie de momentos claves en su desarrollo, como son:

1. **Periodo de embrión:** se inicia con la fertilización del huevo y concluye en el momento de la eclosión.
2. **Periodo de embrión de vida libre:** comienza con la eclosión y concluye con la primera toma de alimento externo.
3. **Periodo juvenil:** al inicio de este periodo se establece la alimentación exógena y se expulsa el tapón de melanina. Concluye en el momento de la maduración sexual.
4. **Periodo adulto:** desde la maduración sexual, 6–8 años los machos y 10–12 años las hembras, hasta la muerte.

La duración de cada uno de los periodos anteriores (embrión, embrión de vida libre, juvenil) varía, al igual que en otros peces, en función de la temperatura del medio, de la especie de la que se trate (Wang *et al.*, 1985; 1987; Van Eenennaam *et al.*, 1996; Hardy & Litvak, 2004; Van Eenennaam *et al.*, 2005) y de la cantidad de reservas de vitelo presentes en el embrión y de la temperatura de mantenimiento (Elbal, 2000).

2.2.2. Estadios de desarrollo

Para continuar las propuestas de otros investigadores y facilitar la comparación de nuestros resultados se han utilizado los 35 estadios en el desarrollo embrionario de los Acipenséridos descritos por (Dettlaff & Ginsburg, 1954; Ginsburg & Dettlaff, 1955, 1969, 1975; Dettlaff et al, 1981), en (Dettlaff *et al.*, 1993).

Según estos autores, el desarrollo de los esturiones (Acipenséridos) se puede subdividir en diferentes periodos sucesivos o etapas que comprenden diferentes estadios de desarrollo, considerando cada estadio de desarrollo como aquel en el que aparecen determinadas estructuras claramente perceptibles.

Después de la fecundación que se considera como el momento en que comienza el desarrollo embrionario podemos dividir éste en 6 etapas:

- *Segmentación*: Comprende desde el *Estadio 1* hasta el *Estadio 12*.
- *Blastulación*: Abarca desde el *Estadio 13*, correspondiente al inicio de la gastrulación (gastrulación temprana) hasta el *Estadio 18* donde la gastrulación es completa y el blastoporo presenta una forma parecida a una línea.
- *Neurulación*: desde final del *Estadio 18* hasta el *Estadio 23*.
- *Final de la neurulación hasta la fusión de las placas laterales*: *Estadio 23* a *Estadio 26*.
- *Desde la fusión de las placas laterales hasta el inicio del latido del corazón*: *Estadio 26* a *Estadio 28*.
- *Desde el inicio del latido del corazón hasta la eclosión del primer embrión (Te)*: *Estadio 28* a *Estadio 35*.
- *Eclosión en masa (Tem) (mass hatching)*: **Estadio 36**

El desarrollo embrionario y los estadios de desarrollo para *A. naccarii* se han realizado también siguiendo el ejemplo de otros Acipenséridos, como el desarrollo del esturión blanco, *Acipenser transmontanus* (Wang *et al.*, 1985), *A. medirostris* (Ayres, 1854) y el esturión ruso, *A. gueldenstaedti* (Dettlaff *et al.*, 1993).

La elección de *A. gueldenstaedti* no es casual, filogenética y biogeográficamente es uno de los esturiones más cercanos a *A. naccarii*, según los análisis genéticos (Ludwig *et al.*, 2001; Robles *et al.*, 2004).

Para el desarrollo del embrión de vida libre se han tenido en cuenta los estadios definidos por (Dettlaff *et al.*, 1993) que establecen 9 estadios de desarrollo (Estadio 37 – 45), desde el momento en que salen de las membranas hasta la reabsorción de la totalidad del saco vitelínico y comienzo de la alimentación activa y donde cada etapa se ha caracterizado tal y como se describe en el subcapítulo 3.2. Embrión de vida libre. La fase juvenil se ha estudiado hasta los 3 meses (pe).

También, debemos tener en cuenta que el crecimiento y desarrollo de una población de individuos en acuicultura, al igual que en la naturaleza, sigue una distribución normal, es decir, aunque la mayoría de los individuos se encuentra dentro de un estadio determinado, siempre existirán unos poco más adelantados a dichos estadios y por el contrario, otros pocos más atrasados. De modo que para estimar la cronología y duración de los estadios de desarrollo (en horas y minutos), tras la fertilización, los tiempos se tomaron cuando más del 50% de los huevos alcanzaba un estadio definido.

2.3 Técnica de tinción

El fundamento de una tinción consiste en producir contraste de las estructuras teñidas respecto de las que no lo están, de forma que las podamos observar a simple vista o con ayuda de una lupa o microscopio.

La técnica de tinción cartílago–hueso en la que se utilizan azul Alcian y rojo Alizarina es una técnica bastante extendida y utilizada no sólo en peces sino también con pequeños mamíferos como roedores. Es una técnica relativamente fácil mediante la que se tiñen gracias al azul Alcian las estructuras cartilagosas y por el rojo Alizarina las estructuras óseas.

Son muchos los autores que han descrito y realizado propuestas para diferentes especies, (Song & Parenti, 1995; Inonye, 1976; Wassersug, 1976; Dirgerkus & Uhler, 1977; Kimanel & Trammel, 1981; Taylor & Von Dyke, 1985; Francillon & Meunier 1985; Parenti, 1986; Klymkowsky & Hanken, 1991; Webb & Byrd, 1994;). Esta técnica se ha utilizado para embriones de peces marinos en el estudio del desarrollo del esqueleto, para detectar anomalías en el *Pagrus major* (Matsuoka, 1985), en la lubina *Dicentrarchus labrax* (Danlas *et al.*, 1999; Boglione *et al.*, 1993; Marino *et al.*, 1993) y en la dorada (Konmoundouros *et al.*, 1997; Faustino & Power, 1998). Muchos embriones de peces teleósteos en cultivo y durante los estadios tempranos de desarrollo presentan anomalías, además su longitud es de unos pocos milímetros, con estructuras esqueléticas en el rango de micras, por lo que uno de los

problemas que se puede encontrar en esta técnica es la pérdida de material calcificado y la consecuente ausencia de hueso sobre todo cuando los ejemplares son extremadamente pequeños.

Las soluciones muy ácidas causan rápidamente la desmineralización de las pequeñas estructuras aún poco calcificadas.

El azul Alcian con un pH entre 0.5 y 1.0 tiene una alta afinidad por los sulfatos mucopolisacáridos, compuestos mayoritarios del cartílago. A pH superior a 2.5, el azul Alcian pierde la especificidad por los sulfatos mucopolisacáridos. Por otro lado, el rojo Alizarina es más afín a estructuras calcáreas en alcalinidad media. (Pearse, 1985; Kiernan, 1990; Gavaia *et al.*, 1999). Estos últimos utilizaron la doble tinción cartílago y hueso en peces teleósteos tales como *Solea senegalensis*, *Sparus aurata*, *Diplodus spp.*, y *Halobatrachus didactylus*, para detectar la mineralización en embriones recién eclosionados de 2.6 mm de longitud.

Tal y como se ha comentado, los esturiones son un grupo de peces muy característicos que se han mantenido a lo largo del tiempo sin apenas cambios evolutivos, manteniendo prácticamente sin variación estructuras muy primitivas, de tipo cartilaginoso, pero además, su cuerpo se encuentra cubierto con una serie de placas o espinas de diferentes formas y tamaños que parecen ser de tipo óseo. Para poner de manifiesto cuáles de estas estructuras son de tipo cartilaginoso, cuáles de tipo óseo, si las de tipo óseo primero son cartilaginosas después se van osificando y desde que edad o tamaño aparecen, decidimos aplicar dicha técnica de tinción cartílago-hueso a algunos ejemplares.

2.4 Apendices

2.4.1. Protocolos utilizados

Fijación del material

Los ejemplares previamente a la aplicación de esta técnica deben estar fijados y bien conservados.

Nuestros ejemplares se conservaron de forma individual, debidamente etiquetados en formaldehído al 5 %, líquido de Bouin y MAW.

Tinción cartílago–hueso (protocolo 1-2)

modificado en función del tamaño ejemplar

1. Fijar el material en formol al 10%
 - 7 – 10 días / 2 – 3 días
2. Lavar varias veces en agua destilada
 - 4 - 5 días / 2 –3 días
3. Pasar a una solución de azul alcian 8GN
 - 75 minutos / 24 – 48 horas
4. Etanol de 95%
 - 2 – 3 horas o hasta que el ejemplar se hunda
5. Etanol de 85%
 - 2 – 3 horas o hasta que el ejemplar se hunda
6. Etanol de 75 %
 - 2 – 3 horas o hasta que el ejemplar se hunda
7. Etanol de 40%
 - 2 – 3 horas o hasta que el ejemplar se hunda
8. Etanol de 15%
 - 2 - 3 horas o hasta que el ejemplar se hunda
9. Lavar con agua destilada
 - 2 - 3 horas o hasta que el ejemplar se hunda
10. Lavar con agua destilada
 - 2 – 3 horas o hasta que el ejemplar se hunda
11. Solución de tripsina,
 - tiempo variable en función del tamaño del animal normalmente hasta que los huesos y el cartílago se vean claramente y la carne no retenga color azul.
 - este estado puede durar 2 ó 3 semanas

12. Disolución de hidróxido potásico 0.5 % KOH acuoso con rojo alizarina
 - dejar 24 horas o hasta que se tiñan los huesos
13. Pasar a una serie de mezclas de potasa y glicerina hasta glicerina pura
 - solución de hidróxido potásico (KOH) 0.5 % y glicerina (3:1); (1:1) y (1:3)
 - a las dos primeras soluciones (3:1) y (1:1) se le pueden añadir 3 ó 4 gotas de agua oxigenada por cada 100 ml de solución para blanquear los pigmentos oscuros, incluso se pueden dejar en la mezcla varios días.
14. Guardar los ejemplares en glicerina pura a la que se han echado unos cristales de timol para inhibir el crecimiento de mohos y bacterias.

Tinción cartílago–hueso (protocolo 3), modificado

Gavaia *et al.* (1999), para ejemplares de algunos teleósteos muy pequeños, varios milímetros.

Fijación

Los ejemplares se fijan en ácido etil-éter 3-aminobenzoico. Las muestras se guardan en oscuridad durante 1 – 2 h a Tª 4º C cuando se trabaje con embriones de 2.5 – 3.0 mm. Si el tamaño de los embriones es mayor, el tiempo de fijación debe ampliarse a una semana a 4º C para asegurar el proceso de fijación.

Lavado

Después de retirar el fijador procurando que no quede nada, los embriones – alevines se lavan con TBST (Tris – Buffered Saline Tween -20), cada 3 ó 4 minutos, siempre para ejemplares del tamaño citado anteriormente y a continuación se lava con agua destilada durante 5 min. El objetivo de estos lavados es eliminar el fijador residual para evitar la degradación de tejidos y facilitar la penetración del colorante.

Fijador	Agua destilada
3 – 4'	5'
8 – 9'	13 – 14'
18 – 19'	23 – 24'

Conservación

Se conservan en 70-100% de etanol y se procede después a la tinción cartílago hueso si se desea.

Tinción de cartílago

- Lavar en agua

- Directamente introducir en la solución de Azul Alcian

En algunos museos los embriones se deshidratan antes de la tinción introduciéndolos en una serie de alcohol.

Los embriones se tiñen en toda su longitud con la solución azul Alcian para que penetre en sus tejidos:

- 3 mm aproximadamente 10 min
- 6 mm aproximadamente 20 min

Neutralización

Después de la tinción, se transfieren los especímenes durante unos minutos en un baño de etanol absoluto con KOH al 1% (unas gotas) a fin de neutralizar los restos ácidos que quedan en los tejidos.

Maceración

Se transfieren los individuos a otro baño de etanol absoluto sin KOH y a continuación se van pasando por una serie de alcoholes de mayor a menor gradación. Después se pasan a una disolución de KOH (0.5 – 2 %) hasta que los tejidos están limpios.

Tinción de huesos

Los especímenes se introducen durante 30' en una disolución de rojo Alizarina que contiene KOH (1 – 2.5%) y rojo Alizarina en proporción 1:5.

Aclarado final

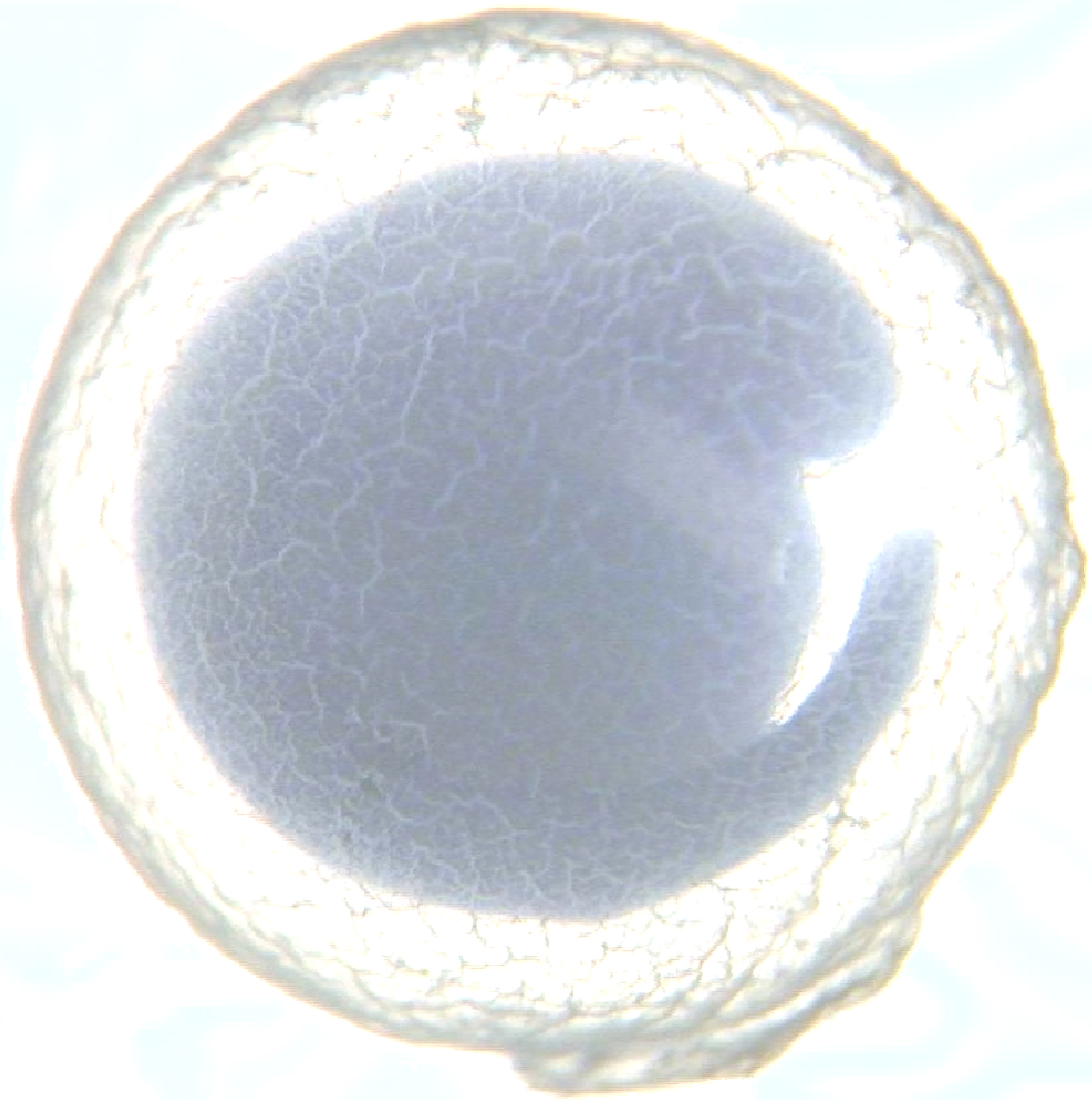
La incubación de los especímenes se realiza en una habitación con iluminación y a una temperatura constante. Si los especímenes están fuertemente teñidos se les puede dar un baño de KOH al 1% al que se le ha añadido unas gotas de H₂O₂.

Conservación

Se van pasando a baños de glicerol/KOH, en proporciones 1:3, 1:1 y 3:1. Si los especímenes están completamente limpios, antes de pasar a glicerol, la solución de KOH se puede sustituir por agua destilada. Se añaden unos cuantos cristales de fenol para prevenir el crecimiento microbiano.

2.4.2. Soluciones

1. Formol al 5 %
 - formol al 37 % (135 ml) tamponado
 - agua destilada (enrasamos hasta un litro)
2. Fijador Bouin (McManus & Mowry, 1968)
 - solución saturada de ácido pícrico 750 ml
 - formaldehído 35 – 45% 250 ml
 - ácido acético glacial 50 ml
3. Fijador MAW (1:1:1)
 - metanol
 - acetona
 - agua destilada
4. Azul Alcian
 - azul alcian (8GN), (8GX) 10 mg
 - alcohol etílico 95 % 80 ml
 - ácido acético glacial 20 ml
5. Solución de tripsina
 - solución acuosa saturada de borato sódico 30 ml
 - agua destilada 70 ml
 - tripsina 1 mg
6. Solución de Alizarina
 - hidróxido potásico KOH al 0.5 % 0.6 g/ 100 ml
 - agua destilada 100 ml
 - alizarina 5 mg
7. Solución de TBST
 - tampón TRIS 50 mM Tris, pH 7.4
 - NaCl 150 mM
 - Triton – X – 100 0.1%



Capítulo 3. Resultados

Este capítulo se divide en cuatro subapartados. En los tres primeros se exponen los resultados pormenorizados del desarrollo de *A. naccarii*, desde la fecundación hasta la etapa juvenil, abarca los tres primeros subapartados que se detallan a continuación. En ellos se muestra la diferenciación característica de cada estadio y el desarrollo de las diferentes estructuras externas que van apareciendo, aletas pares e impares, escudetes dorsales, laterales y ventrales, barbillas, pinnulas, etc. El último subapartado corresponde a la parte de análisis morfométricos.

3.1. Desarrollo embrionario de *Acipenser naccarii*. Abarca desde el momento de la fecundación del huevo, hasta el momento de la eclosión, Estadio 35 y Estadio 36 (eclosión en masa), (Dettlaff *et al.*, 1993).

3.2. Embrión de vida libre. Abarca el periodo desde la eclosión hasta la reabsorción de la totalidad del saco vitelino, (Estadios 37 – 45).

3.3. Etapa juvenil. El tercer apartado del capítulo comprende la etapa juvenil de *A. naccarii*. En ella se estudia el desarrollo y se establecen las características morfológicas externas propias de la especie (Estadio 46 – 51).

3.4. Estudios morfométricos. Aquí se ponen de manifiesto los resultados de las medidas realizadas sobre algunas estructuras específicas, tal y como se describe en (Material y Métodos).

El objetivo del orden así establecido, es facilitar la lectura del documento y establecer una secuencia ordenada del desarrollo ontogénico de *Acipenser naccarii*.

3.1. Desarrollo Embrionario de *A. naccarii*

3.1.1. Primeros estadios del desarrollo embrionario de *A. naccarii*

Huevos no fecundados

En cuanto a la apariencia externa y estructura del huevo de esta especie, se puede observar que, en general, los huevos presentan una forma ovoide, aunque algunos pueden ser más alargados o globulares. El tamaño de los huevos no fecundados de *A. naccarii* oscila entre 2.4 y 2.8 mm, aunque cuando se produce la fecundación existe un ligero aumento en el tamaño del mismo por hidratación. El tamaño de los huevos varía también entre las diferentes especies de Acipenséridos, (Tabla 3 y Figura 12). En cuanto a la coloración, los huevos son grisáceos aunque algunas regiones reflejan la polaridad de su estructura interna lo que hace que se vean con diferentes tonalidades.

Tabla 3. Comparación del diámetro de huevos no fecundados en Acipenséridos, modificado de Dettlaff et al., (1993).

Especies	Diámetro (mm)	Referencias
<i>Acipenser transmontanus</i> (Richardson)	3,5 – 4,0	Cherr and Clark (1982)
<i>A. gueldenstaedtii colchicus</i> (V.Marti)	3,2 – 3,8	Dettlaff and Ginsburg (1954)
<i>A. gueldenstaedti</i> (Brandt)	3,0 – 3,5	Berg et al., (1949)
<i>A. brevirostrum</i> (Lesueur)	3,0	Dodswell (1976)
<i>A. stellatus</i> (Pallas)	2,7 – 3,2	Dettlaff and Ginsburg (1954)
<i>A. sturio</i> (L.)	2,6 – 3,0	Berg et al., (1949)
<i>A. baeri</i> (Brandt)	2,5 – 2,7	Sokolov (1965)
<i>A. oxyrhynchus</i> (Mitchill)	2,5	Vladikov and Greeky (1963)
<i>A. naccarii</i> (Bonaparte)	2.4 – 2.8	Domezain (2003)

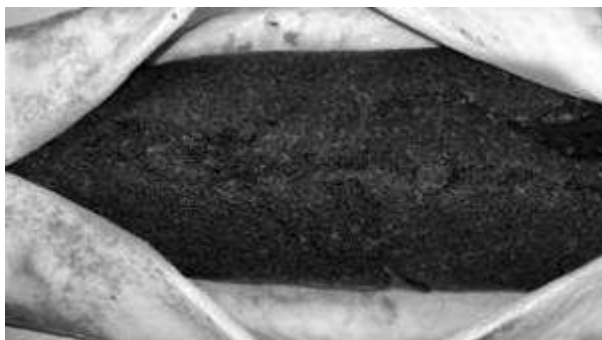


Figura 12. Huevos no fecundados dentro de la hembra. Apariencia de los huevos granulosa y de color gris oscuro.

3.1.2. Periodo de Fecundación

Estadio 2

Tras la fecundación se produce un cambio en la coloración. La longitud aproximada del eje mayor del huevo es de 3.1 mm, lo que le confiere una forma ovoide aunque su aspecto externo parezca globular debido a la membrana gelatinosa propia de la fecundación. A los 20 minutos después de la fecundación (post-fecundación, *pf*), se distinguen claramente los dos polos. El polo animal aparece un poco más claro rodeado de un anillo de pigmento oscuro (Figura 13), al cual se ha llamado punto polar claro (*LPS*), siguiendo la nomenclatura de Dettlaff (Dettlaff *et al.*, 1993). La membrana gelatinosa o corion presenta apariencia rugosa.

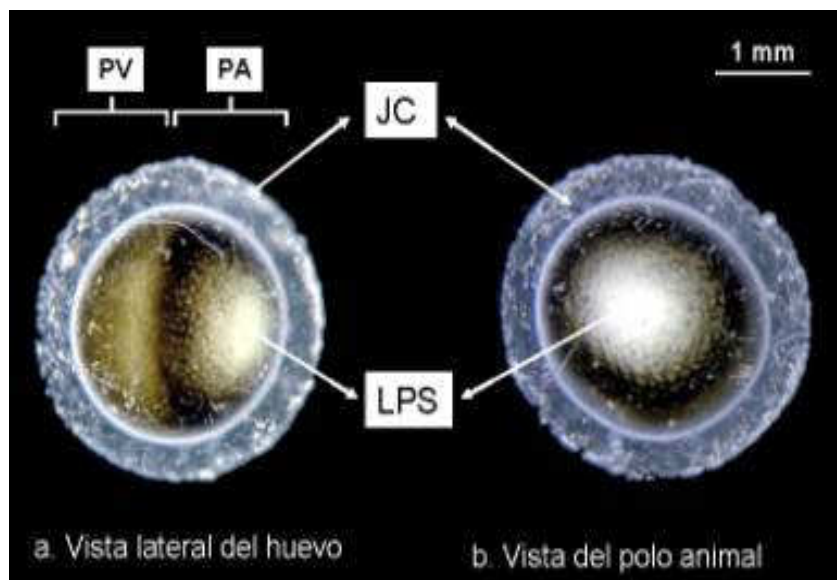


Figura 13. Estadio 2. Huevo a los 20 minutos de ser fecundado (post-fecundación (*pf*)) Vemos la apariencia externa del huevo después de la fecundación, donde se ha segregado el coloide hidrófilo, (*JC*). **a.** Vista lateral (polo animal (*PA*) y polo vegetativo (*PV*)) y **b.** Vista desde el polo animal. (*LPS*): punto polar claro, 16X.

El huevo fecundado ha comenzado el proceso de embriogénesis. La duración de ésta ha sido diferente para las distintas cohortes reproductivas. Las cohortes reproductivas de junio del año 2002 y la de junio del año 2003 (incubadas a $15^{\circ} \text{C} \pm 1^{\circ} \text{C}$) eclosionaron a los 7 días 18 horas *pf*, mientras que en la cohorte de julio del año 2002 (incubada a $17^{\circ} \text{C} \pm 1^{\circ} \text{C}$), la eclosión se produjo en el día 5 *pf*.

3.1.3. Periodo de segmentación y blastulación

Estadio 3

El polo animal se pigmenta más, apareciendo un ligero anillo (o media luna) en la porción superior del huevo, mientras que el polo vegetativo muestra pigmentos más claros: etapa de “luna creciente”, 1h 20' pf. (Figura 14).

Estadio 4

El primer surco de segmentación aparece en el polo animal y avanza hacia el polo vegetativo, iniciándose la primera división que forma dos blastómeros iguales. Los surcos se ven en superficie a la 1h 40' pf. Los dos primeros blastómeros están formados a las 2h 20' pf. (Figura 15).

Estadio 5

Cuando el primer surco de segmentación comienza a cruzar la superficie en la región del polo vegetativo, se aprecia una pequeña línea en el ecuador de los dos blastómeros que más tarde da lugar al segundo surco de segmentación. Este surco se empieza a formar antes de que el primero se haya completado, perpendicular a éste, y divide el hemisferio en cuatro blastómeros aproximadamente iguales. Comienza a observarse a las 2h 20' pf como una línea pigmentada más oscura que aparece en superficie justo en la mitad del huevo (Figura 16). La dirección del primer surco de segmentación no aparece orientada con referencia hacia la “luna creciente”, observada en el **Estadio 3**, sin embargo, si lo está hacia el plano de simetría bilateral. En este punto, se observan algunos casos de poliespermia en algunos huevos. En lugar de aparecer los cuatro blastómeros característicos de la segunda división se producen 3 blastómeros (Figura 17).

Estadio 6

Los siguientes surcos son perpendiculares a los primeros (anteriores), hasta que se desarrolla la blástula. Las divisiones son continuas, dando lugar a una zona con numerosos blastómeros en el polo animal. En la tercera división la polarización de células, micrómeros y macrómeros, es aparentemente distinta entre los polos animal y vegetal. La división es radiada lateralmente en el polo vegetativo, dividiendo a éste en varios macrómeros alargados. Esta división se inicia a las 4 hpf (horas pf) (Figura 18).

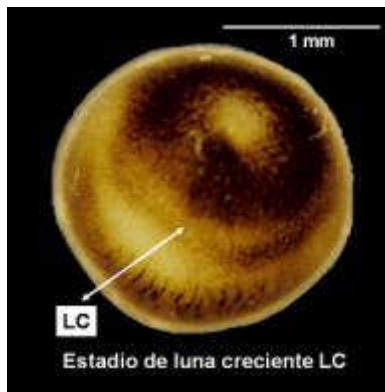


Figura 14. Huevo en la etapa de "luna creciente", LC, correspondiente al **Estadio 3**, formada a 1 h 20' pf, a 17 ° C. Puede apreciarse la acumulación de pigmentos en los alrededores de la región animal, 25X.

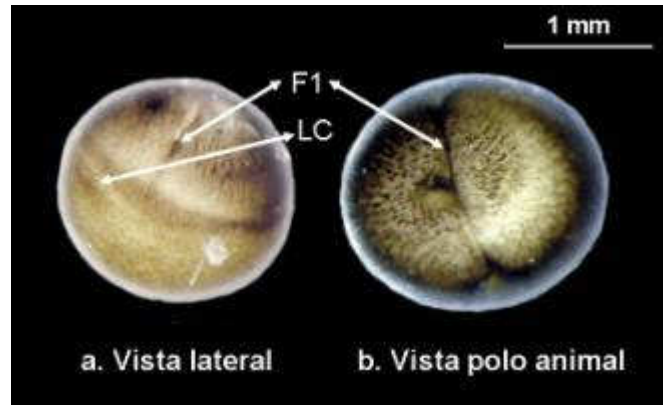


Figura 15. a. Estadio 4. Huevo 1h 40' post-fecundación (pf), inicio de la primera división, donde se puede observar el primer surco (F1) en la superficie del polo animal y la luna creciente (LC). **b.** Formación de dos blastómeros de igual área, 2h 20', tras la fecundación, equivalente al **Estadio 4+**, 25X.

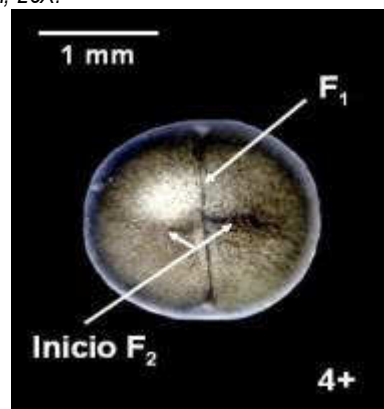


Figura 16. Estadio 4+. Comienzo de la segunda división, F₂, 2h 20' pf.

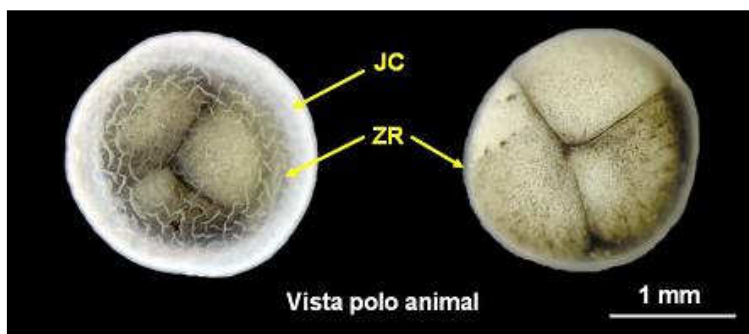


Figura 17. Huevo poliespérmico a las 3 horas post-fecundación (pf), la división resulta asincrónica, tres blastómeros. Se pueden observar el coloide hidrófilo (JC) y la zona radiada (ZR), 25X.

Figura 18. Inicio de la cuarta división en el **Estadio 6+ an**, (vista del polo animal, an, entre estadios 6 y 7) a las 4h post-fecundación a 17°C; región animal dividida en 8 blastómeros, 25X.



Estadios 7 y 8

La región animal queda dividida en 8 blastómeros, completándose esta división a las 4h 40' pf.

En el **Estadio 8** continúa la división celular, dividiéndose el polo animal en micrómeros muy pequeños de variada pigmentación. Se puede diferenciar una zona intermedia con blastómeros de un tamaño medio que separa los polos animal y vegetativo, como una zona de transición.

Estadio 9

A las 5 hpf continúa dividiéndose el polo animal. A medida que pasa el tiempo aparecen bastantes más blastómeros y los surcos van dividiendo también el polo vegetativo que aún mostraba blastómeros de diferentes tamaños (Figura 19). El polo vegetativo finalmente acaba dividiéndose por completo aunque lo hace más tarde que el polo animal.

Estadios 10 y 11

A las 7 h 40' pf se forma una cavidad en el embrión, el blastocele. Las células del polo vegetativo presentan formas bastante alargadas y de mayor tamaño en la blastulación temprana. A medida que el huevo se segmenta más y más, los blastómeros parecen disponerse en una capa, como si todos participaran en la superficie externa del embrión. Pronto aparece una cavidad que al principio es tan solo una grieta estrecha formada entre los blastómeros (el blastocele), y que de modo gradual aumenta a medida que va progresando la segmentación. Los blastómeros del polo animal son todavía muy pequeños (Figura 20). La superficie se torna granulosa; desde los bordes del polo animal al extremo del polo vegetativo es patente una gradación de micrómeros a macrómeros.

Estadio 12

Hacia las 16 h 10' pf, la superficie del polo animal parece una superficie lisa y pulida, (los blastómeros sólo son perceptibles al microscopio). Los blastómeros en el polo vegetativo llegan a ser muy pequeños, pero mayores que los del polo animal, con una zona de transición de blastómeros de tamaño intermedio, entre los micrómeros del polo animal y los relativamente más grandes del polo vegetativo. Se llega entonces al estadio de blastulación tardía (Figura 21).

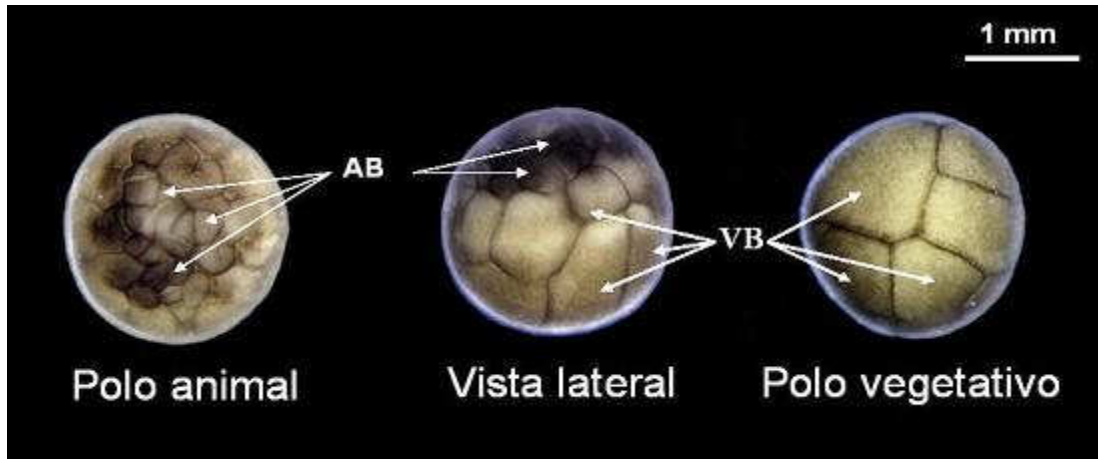


Figura 19. Huevo correspondiente al **Estadio 9**. Polo animal, a las 5h 40' post-fecundación (pf) se han diferenciado numerosos blastómeros (**AB**). Vista lateral, los surcos comienzan a dividir el polo vegetativo, aparecen blastómeros de diferentes tamaños (**VB**); Polo vegetativo: detalle de los blastómeros, 25X.

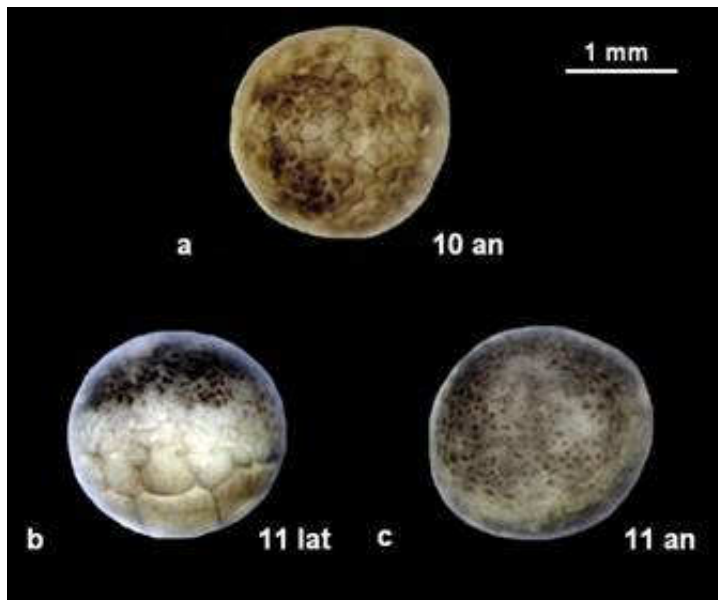
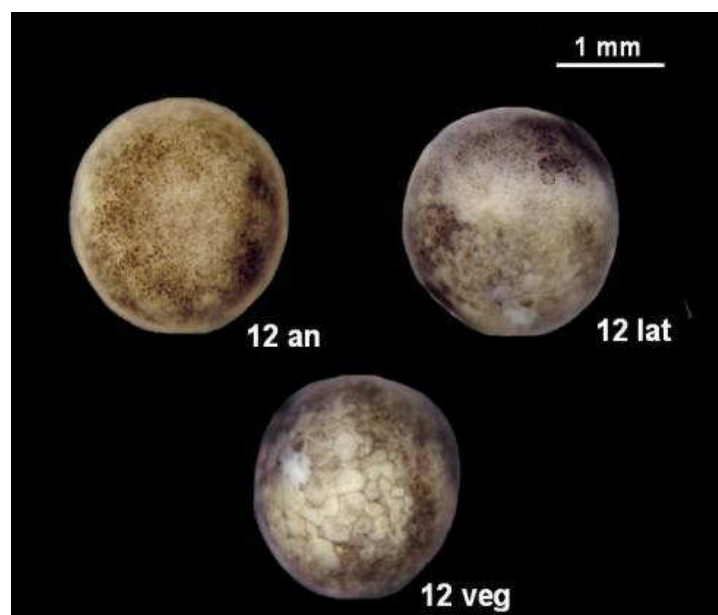


Figura 20. a. Estadio 10. Estadio de blástula temprana vista desde el polo animal (**an**), a las 7h 40' (pf). **b y c.** Correspondientes al **Estadio 11** a partir de 10 hpf; **b. lat**, Vista lateral del huevo (zona de transición entre los dos polos); **c.** vista del polo animal con gran cantidad de blastómeros de más o menos el mismo tamaño, 25X.

Figura 21. Estadio 12. Huevo mostrando un estado de blástula tardía. Se caracteriza porque los blastómeros del polo animal son mucho más pequeños. Vista polo animal (**12 an**), vista lateral (**12 lat**) y vista polo vegetativo (**12 veg**), 25X.



3.1.4. Periodo de Gastrulación

Estadio 13

Al inicio de este periodo se forma una línea estrecha fuertemente pigmentada dentro de un surco (aproximadamente sobre el ecuador del huevo), en el lado dorsal del embrión, donde antes de iniciarse la segmentación se localizaba la “luna creciente”. Esta línea aparece en el límite entre las células de la zona de transición y los blastómeros alargados del polo vegetativo, a nivel del ecuador, a las 20 h 10' pf (Figura 22). Se forma una estría y la lámina de células de la zona de transición adyacente se va invaginando. Este movimiento se realiza hacia el ecuador, girando sobre el margen y desapareciendo en el interior.

Estadio 14

En el estadio de gástrula temprana, comienza a formarse el gastrocele. La invaginación progresa desplazándose el material celular hacia el polo animal. Al mismo tiempo, las estrías se extienden transversalmente y sus extremos laterales se prolongan a lo largo del límite entre la zona de transición y la región vegetal. La invaginación del material se produce por el labio dorsal del blastoporo, que al principio aparece como una pequeña hendidura sobre un área pequeña, a las 21 h 30' pf. (Figura 23).

Estadio 15

El margen de la invaginación avanza sobre la superficie del embrión en la dirección del polo vegetativo. El material del polo animal cubre aproximadamente dos tercios de la superficie del embrión, el blastoporo se va cerrando como un anillo a las 24 hpf (24 h 10'), es decir, 1 día después de la fecundación (dpf). Es la etapa de gastrulación media (Figura 24).

Estadio 16

La invaginación se extiende sobre toda la circunferencia del embrión, el blastoporo se cierra dentro de un anillo. El anillo rodea la región de células más alargadas, que aún no está cubierta por la lámina de células de la capa posterior, formando el tapón de vitelo. El Estadio 16 transcurre a las 25 y a las 26 h pf observamos el Estadio 16 + (Figura 25).



Figura 22. Estadio 13. Inicio de la gastrulación, 16X.

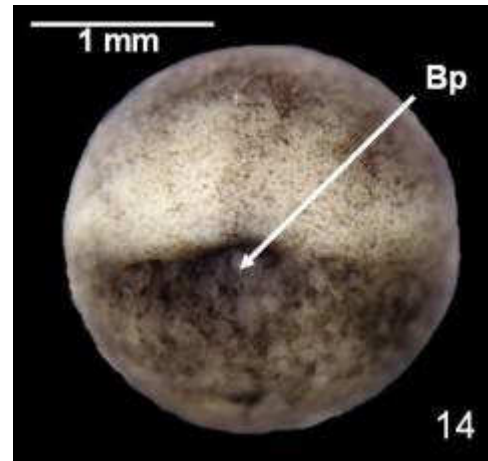


Figura 23. Estadio 14. Gastrulación temprana. Se observa el inicio de la formación del blastoporo, (Bp). 25X.

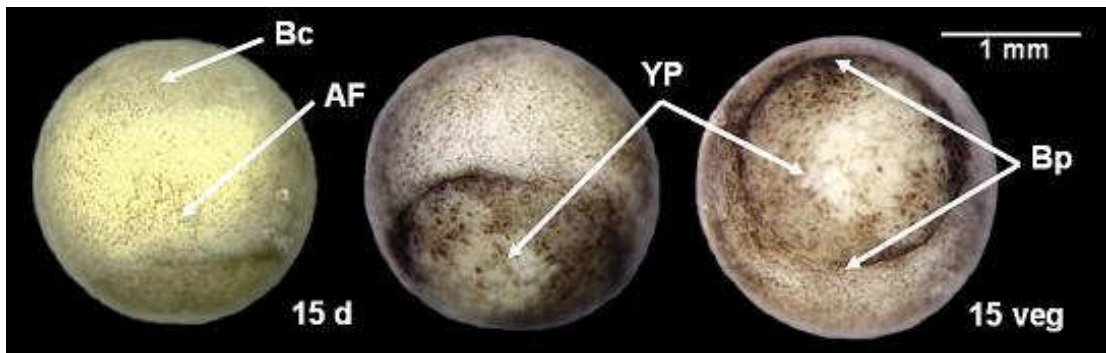


Figura 24. Estadio 15. Gastrulación media; 15 d, vista desde el lado dorsal; (Bc), blastocele; (AF) suelo pigmentado del arquenterón visto desde arriba del mismo sobre el lado dorsal, 15 veg., vista desde el polo vegetativo; ((Bp), blastoporo, (YP), tapón de vitelo), 25X.

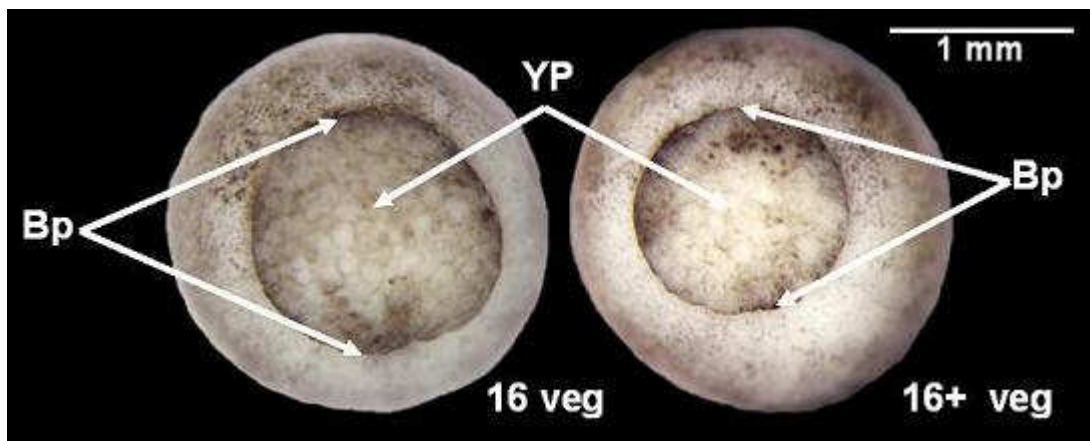


Figura 25. Estadio 16 y Estadio 16+. Vista del polo vegetativo (veg) donde puede apreciarse el blastoporo, (Bp) y el tapón de vitelo, (YP), 25X.

Estadio 17

La epíbolia continúa, produciendo un estrechamiento muy marcado de la lámina de células de la capa exterior a las 27 h pf. Cerca del tapón de vitelo continúan los movimientos de la parte animal (Figura 26).

Estadio 18

Los márgenes del blastoporo se dibujan juntos, el blastoporo aquí parece una línea. Esto marca el final de la gastrulación. A las 32 h pf, los labios laterales se aproximan entre sí, el tapón de vitelo se puede ver como un punto y los márgenes del blastoporo se acaban cerrando (Figura 27). Más adelante, el centro de gravedad de la masa se desplaza y ésta rota unos 90°. Esta rotación orienta el desarrollo del embrión al lado dorsal y el tapón de vitelo queda en posición lateral.

3.1.5. Periodo de neurulación

El primer indicio de la formación del embrión es un delgado surco, el surco medio-dorsal, que se extiende desde el blastoporo hasta la parte opuesta donde aparece posteriormente el mesencéfalo. Este surco indica el eje embrionario. A ambos lados del surco, paralelas a éste, unas finas líneas de pigmentación señalan débilmente el contorno del embrión en desarrollo (Figura 28). Este estadio representa la transición entre la gastrulación y la neurulación, siguiente etapa del desarrollo.

Estadio 19

Corresponde al estadio de neurulación temprana a las 33 horas pf, donde comienzan a verse los pliegues neurales alrededor de la región anterior que es más ancha en su extremo final, formando la porción cefálica (Figura 29).

Estadio 20

Más tarde se forma una depresión romboidal, y el tronco embrionario se desarrolla alrededor y a lo largo del surco medio dorsal, que formará la placa neural. El tronco y la cola se elevan y resaltan. Durante la neurulación, los márgenes del surco, se extienden y los pliegues neurales aparecen a lo largo de la placa neural. Alrededor de las 34 hpf, y algo más tarde en los estadios siguientes, los pliegues neurales se engrosan y resaltan, por lo que se distinguen claramente (Figura 30).

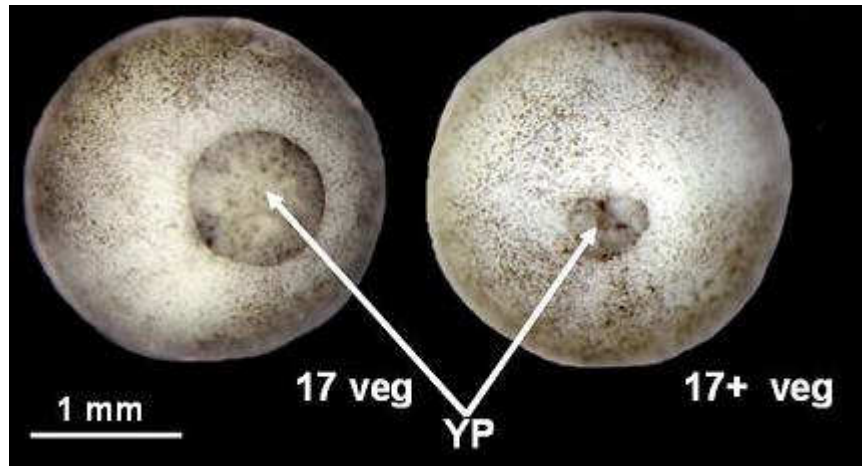


Figura 26. Estadio 17 y Estadio 17+. Se reduce el tamaño del tapón de vitelo (YP), 25X

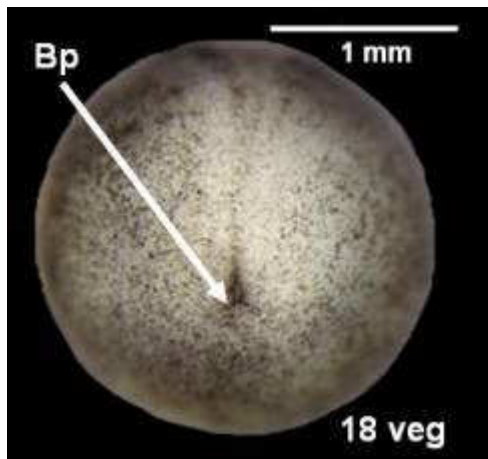


Figura 27. Estadio 18, etapa de gastrulación completa, donde se aprecia una pequeña hendidura correspondiente al cierre del blastoporo (Bp), 25X.

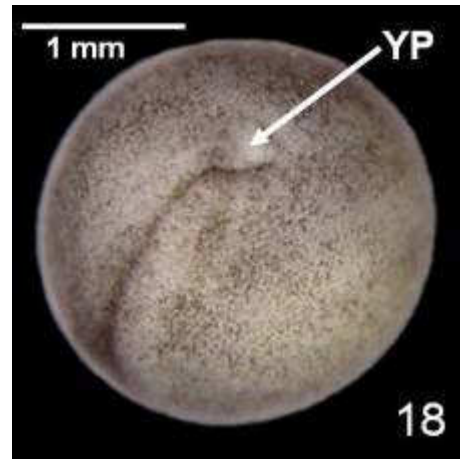


Figura 28. Estadio 18, tapón de vitelo tardío (YP), con indicación del eje embrionario, 16X.



Figura 29. Estadio 19. Neurulación temprana. Comienzan a formarse los pliegues neurales y puede apreciarse levemente pigmentado el surco neural, (NG). La parte más ancha (en el recuadro), corresponde a la porción cefálica, 16X.

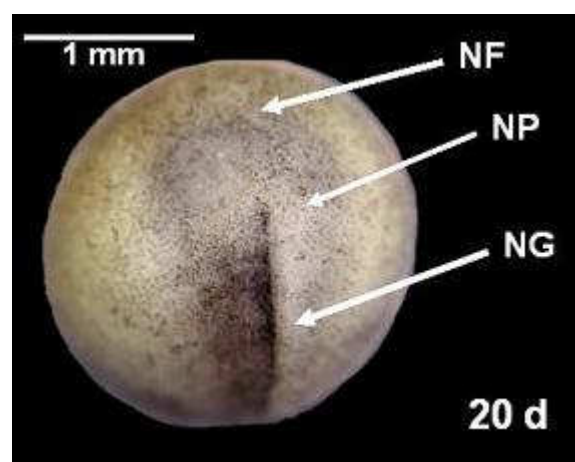


Figura 30. Estadio 20, vista desde el lado dorsal (20 d). En esta región se puede apreciar el surco neural, (NG) la placa neural (NP) y cómo ésta amplía sus límites a los pliegues neurales (NF) en la región anterior, 25X.

Estadios 21 y 22

Se producen aproximadamente a las 35 y 36 hpf respectivamente (Figura 31). Al mismo tiempo, los pliegues neurales se elevan y ensanchan en la parte anterior de la placa neural, tomando forma romboidal.

Estadio 23

A las 38 horas pf los bordes de la placa neural se elevan, curvan y doblan sobre sí mismos hasta formar un tubo, el tubo neural (Figura 32; **23h**). La placa neural se alarga hacia adelante y se cierra gradualmente, comenzando en la región prospectiva del prosencéfalo y progresando hacia la parte posterior. Finalmente, se completa el cierre en la región anterior del mesencéfalo. La hendidura del blastoporo, que se abre al final del lado posterior de la placa neural, se pierde después del cierre de ésta.

La parte dorsal del mesodermo se sitúa a ambos lados de la notocorda, comienza a segmentarse, subdividiéndose en una serie de segmentos primarios, los somitos. La subdivisión comienza en la parte anterior de la región del tronco y progresa gradualmente hacia atrás. Al final de la neurulación, ocho o nueve pares de somitos se destacan débilmente a través de la epidermis a ambos lados del tubo neural cerrado. Las placas laterales finas del mesodermo con una estrecha adhesión, (exterior-parietal, e interior-visceral) se sitúan lateralmente a la notocorda y permanecen indivisos hasta que más tarde, aparece entre ellas el celoma o cavidad secundaria del cuerpo. Junto a los somitos y las placas neurales se diferencia en forma de dos resaltes laterales el esbozo del sistema excretor. Estos rudimentos inician su desarrollo durante la neurulación media (**Estadio 21**), como dos hilos cortos que, a veces, se distinguen a través de la epidermis sobre el lado dorsal. Gradualmente se van extendiendo hacia la parte posterior del cuerpo y se curvan (**Estadio 23**) (Figura 32; **23d y 23lat**).

Estadio 24

El desarrollo continúa con el alargamiento de la región cefálica y la formación de las tres vesículas del cerebro primordial. Entre las 38–43 hpf, el embrión se extiende 160° alrededor del saco vitelínico y presenta un encéfalo rudimentario en la parte anterior del cuerpo, el tubo neural y las placas mesodérmicas, como expansiones laterales a lo largo del tronco. Se aprecian los rudimentos del primer par de arcos viscerales (Figuras 33 y 34). Al final de la neurulación, el embrión del esturión, tiene básicamente, el plan corporal del adulto.



Figura 31. Estadios 21d y 22 d, donde se observan los pliegues neurales con su forma romboidal, 25X.

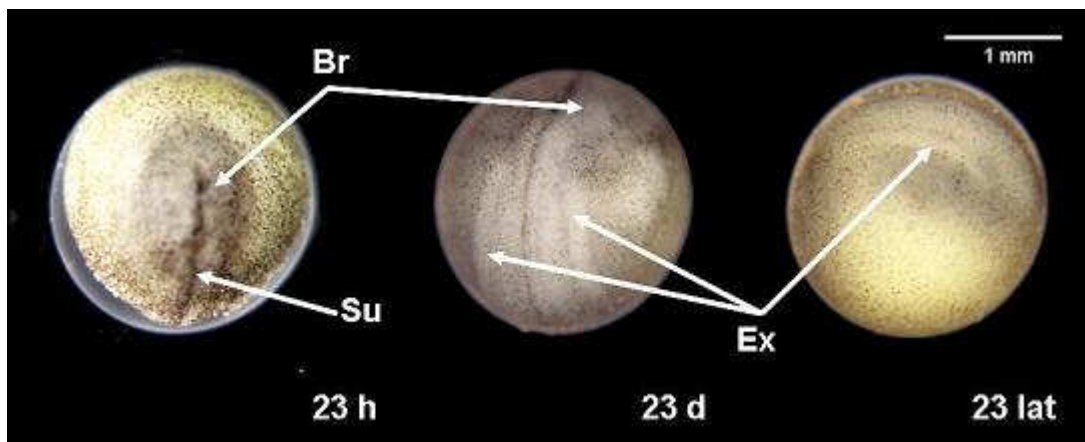


Figura 32. Estadio 23. Etapa de tubo neural cerrado. Claramente perceptible el surco a lo largo de la línea de fusión de los pliegues neurales, (Su). 23 h, vista desde el lado de la región cefálica y 23 d, vista desde el lado dorsal, puede apreciarse la zona correspondiente al encéfalo rudimentario, (Br). 23 d y 23 lat (vista desde el lado lateral), puede distinguirse el rudimento del sistema excretor, (Ex), 16X.

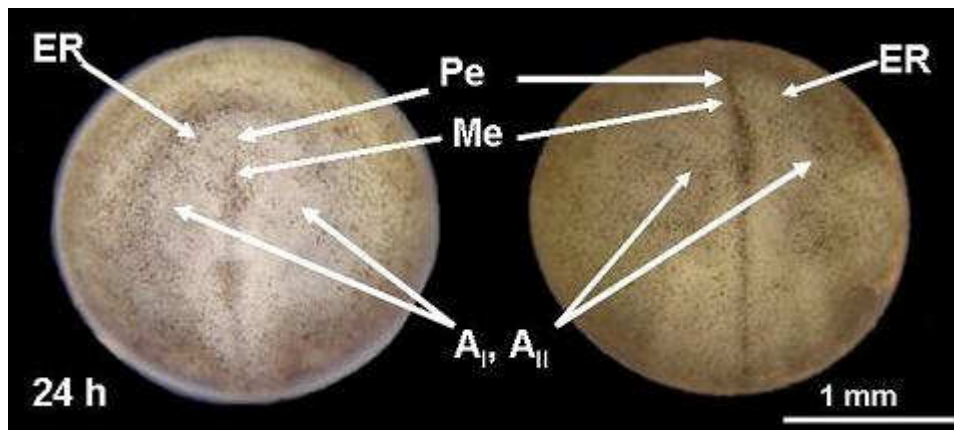


Figura 33. Estadio 24, 24h, etapa donde se aprecian las protuberancias de los ojos (ER), los rudimentos del primer y segundo par de arcos viscerales, A_I y A_{II}, respectivamente. También se aprecian las regiones del prosencéfalo (Pe) y mesencéfalo (Me), 12.5X.

Estadios 25 y 26

El Estadio 25 se produce entre las 44 y 46 hpf y el Estadio 26 en las dos horas siguientes, entre las 46 y 48 horas (2 días post-fecundación; dpf). En este estadio se produce la unión de las placas laterales y se forma el rudimento del corazón en la unión de ambas, en la zona del punto polar claro, (*LPS*) (Figura 35). Se puede observar que la cabeza permanece aún pegada a la superficie del saco vitelínico pero se inicia la separación del rudimento del tronco posterior y regiones de la cola (*T*). A las 44 hpf, comienzan a diferenciarse en la parte anterior el rudimento de la epífisis (*PR*), como una pequeña línea algo más pigmentada, la glándula de eclosión (*HG*) y lateralmente las zonas *A_I* y *A_{II}*, correspondientes a los rudimentos del primer y segundo arco visceral respectivamente, y en la parte anterior dorsal los rudimentos de los ojos (*ER*) como dos pequeños abultamientos. En la parte posterior de la cabeza, la zona con forma triangular que aparece más oscura corresponde a la cavidad del mielencéfalo (*MyC*) (Figura 35).

Al principio, el rudimento de la región posterior toma la forma de un lóbulo amplio y aplanado, **Estadio 25**. (Figura 34a).

Al incubar a 15° C el **Estadio 26** tiene lugar entre las 82 y 88 horas, (3dpf + 16 h).

En estos estadios, no se percibe ningún tipo de movimiento ni cambios de posición del embrión dentro del huevo. Al final de ambos estadios se han desarrollado los arcos viscerales, aparecen los conductos excretores, que son distinguibles, se forman el corazón, los vasos sanguíneos, las bolsas branquiales y el divertículo hepático. Aparecen las fibras musculares, las células sanguíneas y se vasculariza la notocorda.

Estadio 27

La región anterior, perteneciente a la cabeza, permanece durante mucho tiempo unida a la superficie del saco vitelínico y se separa gradualmente de éste mediante un pliegue delantero que aparece al final de este periodo (Figura 36), mientras que la parte posterior continúa estrechándose y se eleva tomando forma de barra. (Estadio 27t, Figura 36 y 37b). Los embriones incubados a 17 °C llegan al Estadio 27 a las 49 horas mientras que a 15° C lo alcanzan entre las 88 – 92 horas.

Figura 34. Estadio 24, 24d, vista desde el lado dorsal, se observan los rudimentos del sistema excretor (**Ex**) y en la cabeza, la región del rombencéfalo, (**Re**). 12.5X

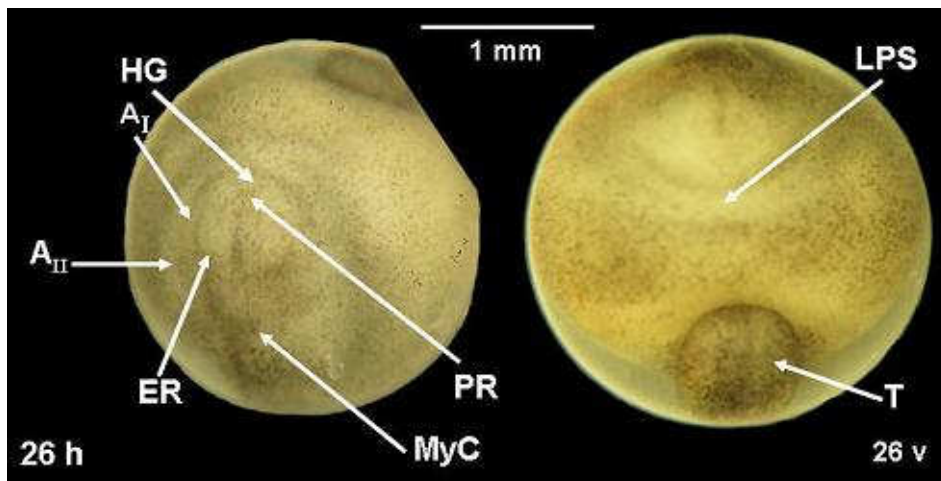
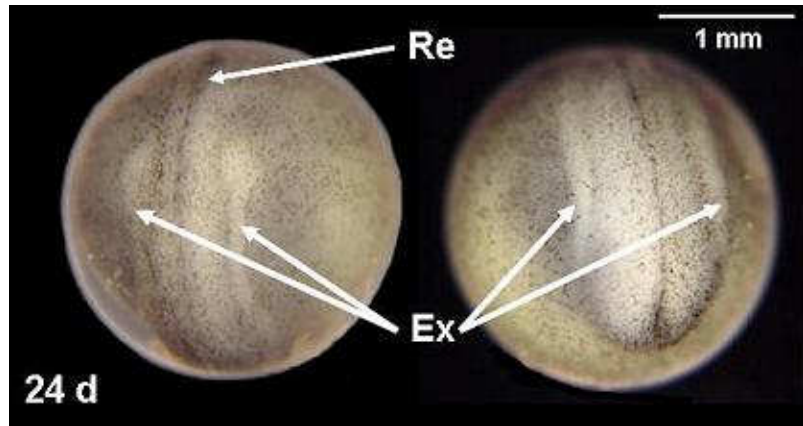


Figura 35. Corresponde al Estadio 26. Se pueden diferenciar las distintas estructuras descritas en el texto. En 26 h (vista desde el lado de la cabeza), en la parte posterior la zona con forma triangular, que aparece más oscura, que corresponde a la cavidad del mielencéfalo (**MyC**); el rudimento de la epifisis (**PR**), como una pequeña línea algo más pigmentada, la glándula de eclosión (**HG**) y lateralmente las zonas **A_I** y **A_{II}**, correspondientes a los rudimentos del primer y segundo arco visceral respectivamente; los rudimentos de los ojos (**ER**) como dos pequeños abultamientos. En vista ventral, 26 v, podemos diferenciar claramente la cabeza de la cola (**T**). Aún se aprecia la zona del punto polar claro (**LPS**), 12.5X.

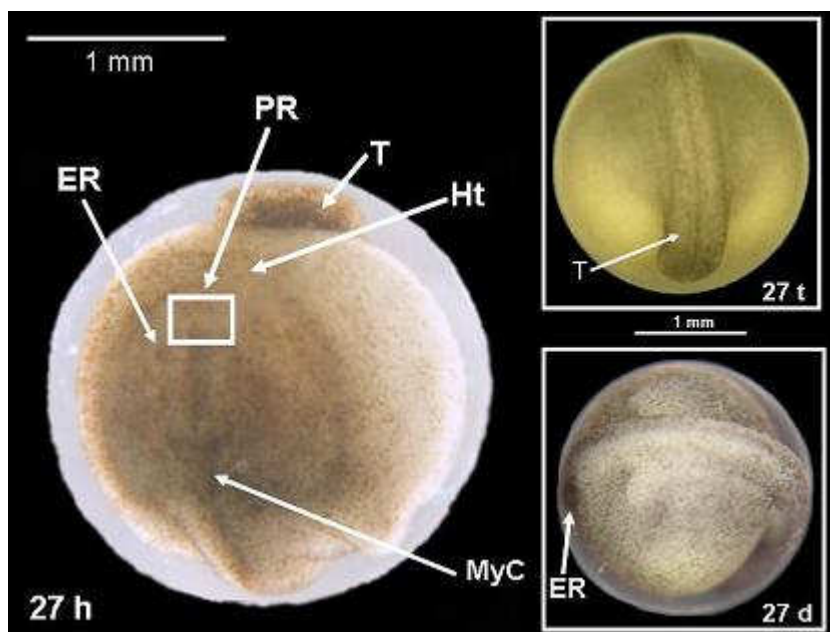


Figura 36. Estadio 27, (vista desde la zona de la cabeza, 27h) claramente definida. Se aprecia: la cavidad del mielencéfalo (**MyC**) con forma triangular y más pigmentada; los rudimentos de los ojos, como dos puntos algo más marcados (**ER**), la zona encuadrada en rojo representa el lugar de formación del rudimento de la pituitaria (**PR**) y justo por delante se encuentra la zona donde se está formando, como un tubo corto, el corazón (**Ht**). En la 27t, detalle de la cola y en 27d (vista dorsal) se observa una elevación más marcada de la parte del tronco y se distingue el rudimento de uno de los ojos (**ER**). 25X.

Estadio 28

A las 52 horas, (2dpf + 4 horas), la cabeza comienza a separarse de la superficie del saco vitelínico, mientras que los rudimentos de las regiones posteriores del cuerpo, se separan antes mediante la formación del pliegue caudal del cuerpo, durante los Estadios 25 y 26.

Al mismo tiempo, los órganos axiales se alargan, especialmente en la región anterior. El mesodermo axial no se divide, se une al final del tubo neural hacia la línea media dorsal, formando una zona abombada que se eleva un poco sobre la superficie del embrión, formando el primer rudimento de las regiones troncal y caudal.

Si se retiran las membranas embrionarias en los **Estadio 26–28** (Figuras 34 a 39), se puede ver en los embriones, cómo los rudimentos de las regiones posteriores del cuerpo se separan del saco vitelínico cuando dejan de estar sujetos por dichas membranas. Al final de este proceso aparece un punto oscuro que indica, según Dettlaff *et al.*, (1993) una extensión de la cavidad estomacal hacia el final de la región caudal en la conexión con la cavidad del tubo neural (**Estadio 27t**, Figura 38).

Como ya se ha apuntado anteriormente, a diferencia del rudimento de las regiones troncal y caudal, la región delantera, permanece pegada a la superficie del saco vitelínico durante más tiempo. Esta región se eleva notablemente, pero lo hace sólo después de que se produzca la formación del rudimento de corazón (**Estadio 28**; Figura 38a). Desde los **Estadios 25 a 28** (Figuras 36 a 39), es posible apreciar cómo tanto la parte delantera como el rudimento de las regiones troncal y caudal se han elevado.

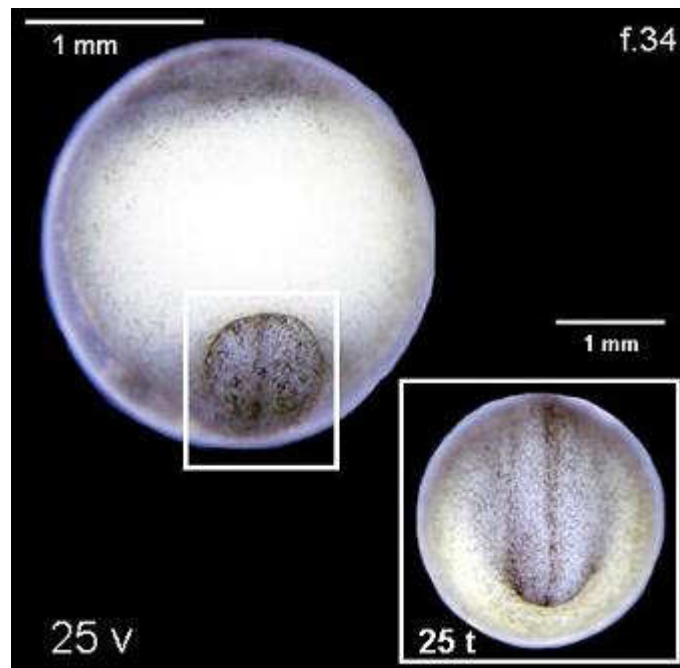


Figura 37. Muestra el **Estadio 25**. Detalle de la región caudal, **25 v** (vista ventral) y **25 t** (vista desde la zona caudal). Las regiones posteriores (troncal y caudal) tienen forma de lóbulo amplio y aplanado.

La pigmentación en estas etapas es desigual para las diferentes partes del cuerpo, bastante intensa en la zona dorsal y va disminuyendo su intensidad en la parte ventral. Este contraste en la pigmentación nos permite observar con bastante claridad las diferentes estructuras.

La parte anterior, más ancha, del tubo neural comienza a alargarse al final de la neurulación. Se divide en dos regiones y, luego en las tres vesículas cerebrales primarias debido al crecimiento desigual de sus paredes: cerebro anterior o prosencéfalo, cerebro medio o mesencéfalo, y el cerebro posterior, o rombencéfalo.

En el intervalo final de este periodo (**Estadio 27-28**) el prosencéfalo da lugar al telencéfalo con los lóbulos olfativos y el diencéfalo con los “procesos” ópticos, epífnis y el infundíbulo de la hipófnis. El mesencéfalo no se subdivide, mientras que el rombencéfalo da lugar al mielencéfalo, o médula oblongada, y al rudimento del metencéfalo o cerebelo. Las crestas neurales se cierran sobre el tubo neural por desarrollo de filas de células longitudinales a partir de los pliegues neurales que da lugar a la formación de los ganglios neurales y al esqueleto visceral.

La glándula de eclosión aparece, una vez que las tres vesículas cerebrales primarias se han formado, como una ligera placa en forma semilunar delante del cerebro primario y cuya curvatura sigue la pared a la que está adherida. Simultáneamente con el cierre del tubo neural, los arcos viscerales comienzan a desarrollarse. Los abultamientos de las partes externas de los pliegues neurales, en el nivel del mesencéfalo, que se formaron durante la neurulación media, aumentan y rodean lateralmente el rudimento del cerebro primario, como si fuesen dos alas que se despliegan.

Como la región delantera se alarga y las vesículas cerebrales se separan, los rudimentos de los arcos viscerales, (A_1, A_2, \dots, A_n) rodean los procesos ópticos, creciendo hacia delante y acercándose a los bordes del rudimento de la glándula de eclosión **Estadio 26**, (Figura 35). Al principio de este período, el número de somitos se incrementa notablemente debido a la rapidez con la que se divide el mesodermo desde la cabeza hacia la cola. Sólo el mesodermo del final del rudimento de las regiones troncal y caudal permanece sin dividirse y la notocorda no se separa de éste. Al mismo tiempo crecen las células musculares y los miotomos van adquiriendo la morfología típica en “<” de la musculatura lateral del cuerpo.

A lo largo de los diferentes estadios desde el 23 al 30 (**Estadio 23–24**; Figuras 32, 33 y 34) se observan en la parte dorsal de los embriones los cambios que se van produciendo en la formación del aparato excretor, claramente visibles desde el exterior, que se va alargando a ambos lados de la placa neural, **Estadios 26-28d**; con más detalle lo podemos ver en la (Figura 39b)

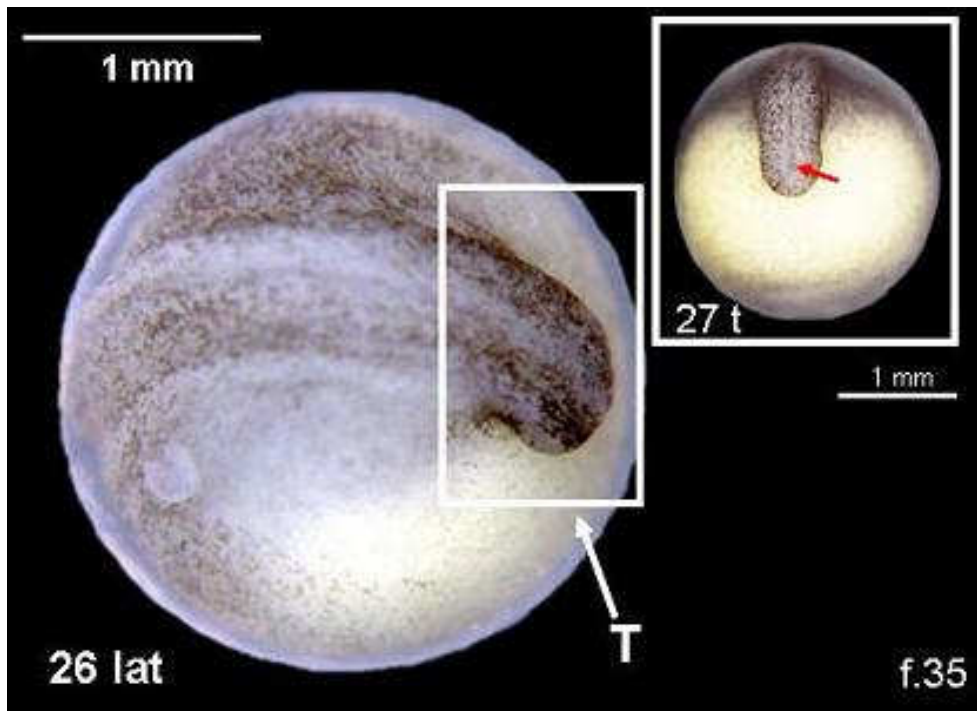


Figura 38. Estadio 26 (vista lateral, **26 lat**) y vista desde la región caudal. En la parte superior derecha, **27t**, se aprecia que la separación de la cola de la superficie del saco vitelínico está más acentuada y la región posterior se ha elevado y ha tomado forma de barra. La flecha roja indica el punto oscuro que según Dettlaff et al., (1993) es la extensión de la cavidad estomacal hacia el final de la región caudal en la conexión de la cavidad del tubo neural, 25X.

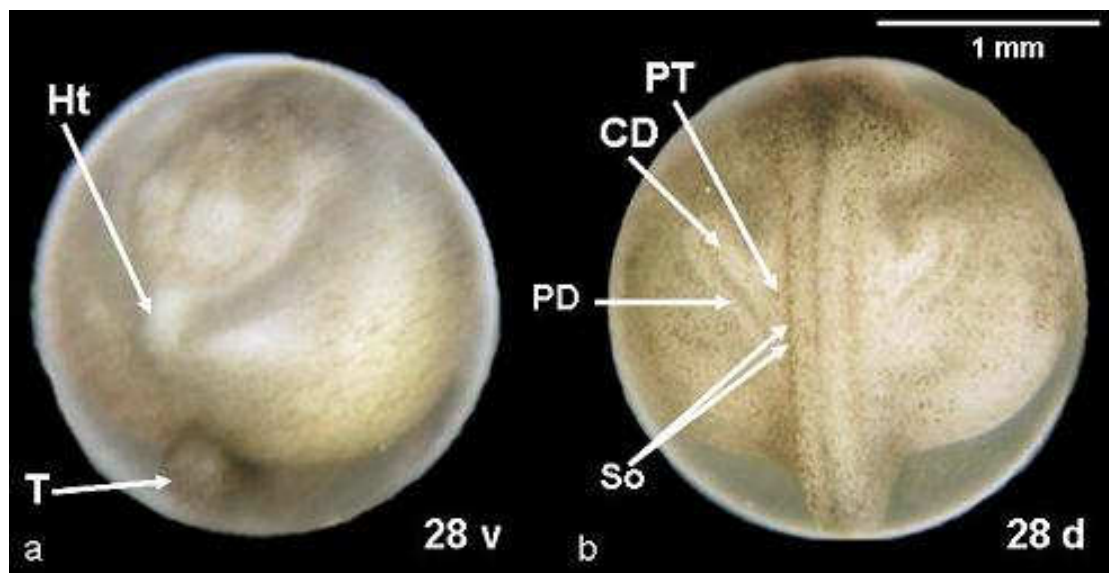


Figura 39.a. Estadio 28 en vista ventral (**28 v**) donde se aprecia el rudimento del corazón (**Ht**) como una zona alargada y más clara justo delante de la cabeza, así como la cola (**T**). **39. b. Estadio 28**, vista dorsal (**28 d**). Se observa la parte anterior de la cabeza y posteriormente la elevación de la zona del tronco, con detalle de la estructura de los conductos excretores a través de la cubierta epitelial; (**CD**) porción colectora del conducto excretor; (**PD**) conducto excretor; (**PT**) túbulos excretores, 25X.

El periodo que comprende los **Estadios 28–35** se caracteriza por un crecimiento intensivo del embrión, mientras continúa la diferenciación, el corazón comienza a funcionar y se observa circulación sanguínea. Los embriones comienzan a responder a algunos estímulos externos (mecánicos, químicos), aunque las contracciones musculares son muy débiles, apenas perceptibles.

Durante este periodo, y hasta la eclosión, los contornos del embrión sufren cambios evidentes. La separación de la cabeza, que había comenzado al final del período precedente, progresa rápidamente. Las etapas sucesivas de este proceso se aprecian claramente en los embriones a los que se les retiran las membranas mientras están vivos, **Estadios 29 a 31**, (Figuras 43 y 46) y **Estadios 32 y 33**, (Figuras 48 y 49). La profundización del pliegue entre la cabeza y el saco vitelínico los separa progresivamente. Al mismo tiempo, la glándula de eclosión, que antes fue localizada delante del cerebro, se desplaza totalmente a la parte inferior de la cabeza.

Estadio 29

Tiene lugar entre las 54 – 56 hpf, y los músculos del tronco comienzan a funcionar suavemente como respuesta a estímulos externos. En los embriones se observa la curvatura del tubo cardiaco a partir de las 54 h, como una zona más clara que representa el lugar del rudimento del corazón (*Ht*).

En los embriones, del Estadio 29, ya pueden diferenciarse claramente los ojos (*E*) y los sacos olfativos (*OS*) y la cola comienza a desplazarse lateralmente respecto al eje longitudinal del huevo (**29 lat**; Figura 40 y **29h**; Figura 41).

Mientras que en la zona dorsal (**Estadio 29, (29d)**), (Figura 41), se observan los rudimentos de los túbulos excretores (*PT*), conducto excretor (*PD*) y parte colectora del conducto excretor (*CD*).



Figura 40. Vista lateral de un embrión en el **Estadio 29**, donde se aprecia el ojo (**E**) y la curvatura de la cola. Nótese que en el plano más cercano al lector se encuentra la cabeza, mientras que la cola está en un segundo plano, 8X.

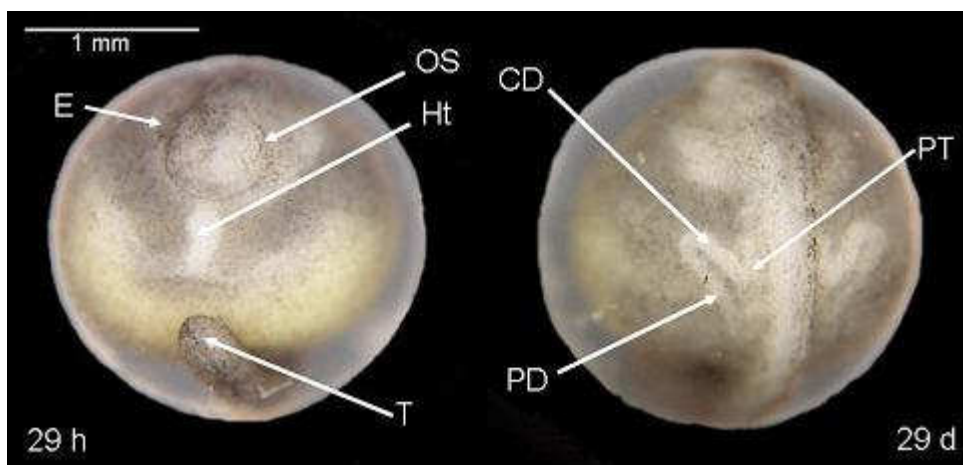


Figura 41. Estadio 29, vista desde la cabeza (**29 h**), el rudimento del corazón, tubo cardiaco, puede apreciarse de color más claro (**Ht**), además se diferencian en la cabeza los ojos (**E**) y el saco olfativo (**OS**) y también se distingue claramente la cola (**T**). En este mismo estadio, (vista dorsal, **29 d**), podemos ver también los rudimentos de los túbulos excretores (**PT**), conducto excretor (**PD**) y la parte colectora del conducto excretor (**CD**), 12.5X.

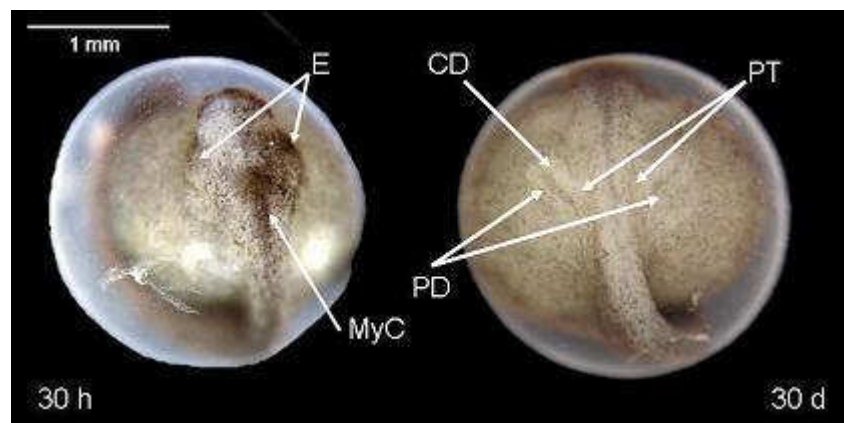


Figura 42. Estadio 30, vista desde la cabeza (**30 h**), la cabeza tiene forma más redondeada. Se señalan los ojos (**E**) y el mielencéfalo (**MyC**). En la vista dorsal, (**30 d**), se observan los rudimentos de los túbulos excretores (**PT**), conducto excretor (**PD**) y la porción colectora del conducto excretor (**CD**) así como una curvatura más patente de la cola, 16X.

Estadio 30

Comienza a partir de las 56 hpf, la mayoría de los ejemplares se encuentran en este estadio entre las 56 – 66 hpf. La punta de la cola del embrión se aproxima a la región pericárdica; la parte posterior del tronco comienza a separarse al tiempo que se reduce el saco vitelínico.

La cabeza, antes aplanada, es ahora más esférica, lo que conlleva el desplazamiento relativo de otros órganos; los orificios olfativos se desplazan hacia la superficie anterior de la cabeza y los ojos aparecen ocupando una posición más lateral y dorsal (**30 h**; Figura 42). A través del epitelio se pueden diferenciar las regiones cerebrales, sacos olfativos y los ojos. A ambos lados de la médula oblonga, están las vesículas auditivas relativamente grandes.

La parte posterior del tronco, el sistema excretor y la región de la cola se alargan y enderezan y comienza a comprimirse el extremo distal de la cola (Figuras 43 y 44). El conducto excretor conecta con la cloaca, **Estadio 30 lat** (Figura 45).

Se observa el pliegue de la aleta (FF), (Figura 45), como una rugosidad del tegumento que se extiende desde la parte posterior de la cabeza por toda la zona dorsal, caudal y ventral hasta conectar con la pared del saco vitelínico, formando el rudimento de todas las aletas impares que siguen la línea media del plano sagital del cuerpo, tanto dorsal como ventralmente.

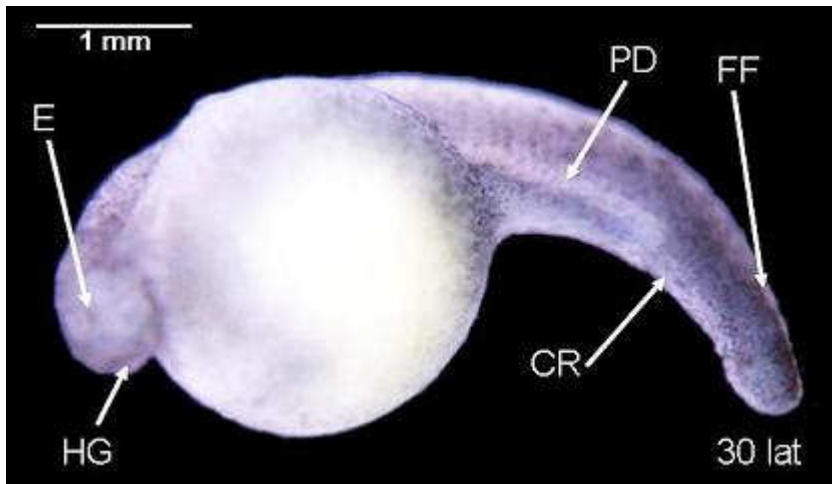


Figura 43. Vista lateral de un embrión, en **Estadio 30** una vez que se han retirado las membranas. De la cabeza a la cola se diferencian, el ojo (**E**), la glándula de eclosión (**HG**) el conducto excretor (**PD**), el rudimento de la cloaca (**CR**) y el rudimento del pliegue de la aleta (**FF**), 12.5X.

Figura 44. Vista ventral de un embrión en el **Estadio 30**, donde (**Ht**), lugar de formación del corazón y en detalle la zona caudal donde se aprecia la separación existente entre la cola y la superficie ventral del cuerpo, 20X.



Figura 45. Embrión en **Estadio 30**, vista lateral (**30 lat**) donde se destaca el ojo (**E**) y vista desde el lado de la cola, (**30 t**) comienza a distinguirse el rudimento del pliegue de la aleta, (**FF**), 25X.



Estadios 31 y 32

La parte posterior del tronco y la cola se comprime. El embrión aparece curvado sobre el saco vitelínico debido a la presión de las membranas (Figura 46). A partir de las 70 horas, entre las 70 – 76 hpf, aproximadamente 3 dpf, la punta de la cola alcanza gradualmente el corazón, Estadio 31 (Figura 47, **31 v**). También se observa como los embriones se mueven dentro de las membranas, movimientos que se hacen más continuos cuando permanecen un tiempo bajo la lupa.

Estadio 32

La punta de la cola alcanza la cabeza, el embrión es capaz de responder a estímulos con oscilaciones de la región posterior del cuerpo y la cabeza, e incluso gira y voltea sobre sí mismo. Los movimientos de las regiones de la parte posterior del cuerpo comienzan un poco antes que los de la cabeza, a partir de las 78 hpf (3 días + 6 hpf) y los somitos se ven claramente a través de las membranas (Figura 47, **32d**).

Cuando se retiran las membranas, se aprecian claramente el rudimento del pliegue de la membrana aletil (FF), los somitos (So) y lateralmente en la cabeza aparece la vesícula auditiva (AV), (Figura 48).

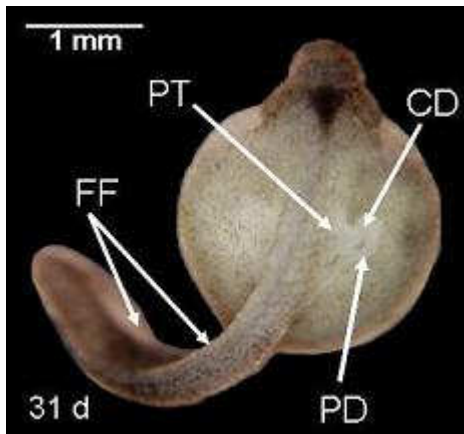


Figura 46. Estadio 31, vista dorsal, 31 d, embrión al que se le han retirado las membranas. En la zona de la cabeza destaca una marcada pigmentación en forma triangular, región del mielencéfalo (**MyC**) así como en la cola. Se destacan algunas estructuras como son la zona correspondiente a los túbulos excretores (**PT**), la zona correspondiente a la parte colectora del conducto excretor (**CD**) y el propio conducto excretor (**PD**), además del rudimento del pliegue de la aleta, (**FF**). La cola aparece más aplanada y rodeada por la "membrana aletil", 12.5X.

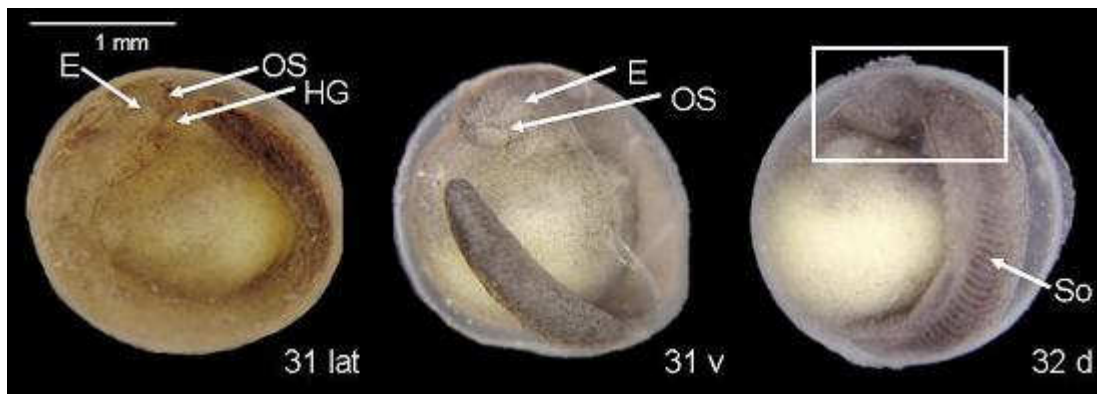


Figura 47. Estadio 31, embriones en diferentes posiciones dentro de las membranas, (lateralmente, 31 lat) donde se distinguen el ojo (**E**), el saco olfativo (**OS**) y más abajo la región donde se sitúa la glándula de eclosión (**HG**). El ojo (**E**) y el saco olfativo (**OS**) también pueden apreciarse en la vista ventral, (**31v**), donde la punta de la cola se aproxima a la zona del corazón. En 32d, correspondiente a un embrión en el **Estadio 32**, a simple vista apreciamos los somitos (**So**) y la zona encuadrada muestra como la punta de la cola que alcanza la cabeza, 20X.

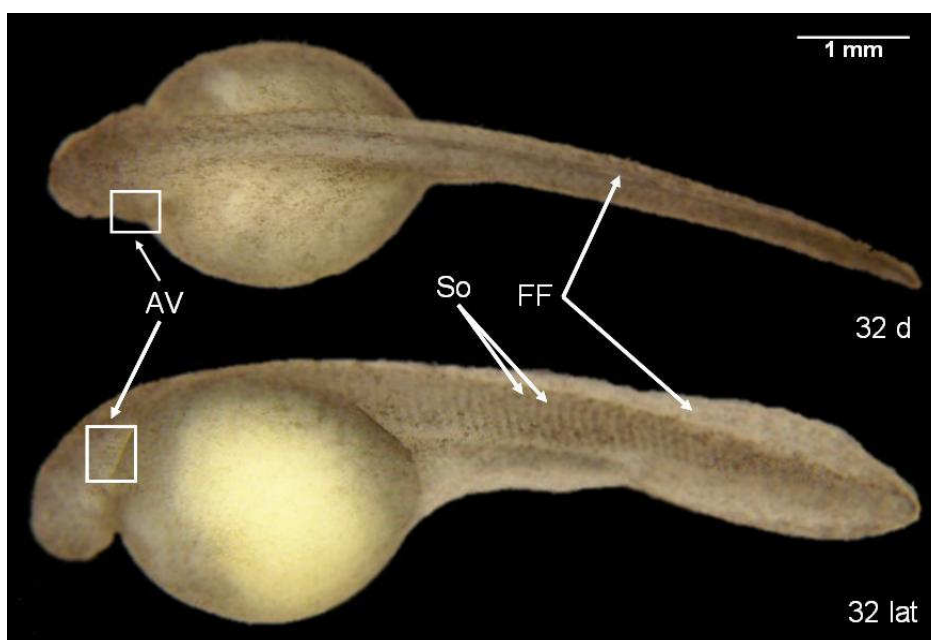


Figura 48. Vista lateral y dorsal de un embrión en Estadio 32 al que se le han retirado las membranas. Se aprecia el rudimento del pliegue de la membrana aletil (**FF**), los somitos (**So**) y en la zona de la cabeza encuadrada la vesícula auditiva (**AV**), 12.5X.

Estadios 33 y 34

Los movimientos de la cabeza se hacen más evidentes. El giro y el volteo que provocan cambios en la posición del embrión dentro de las membranas, se realizan por las contracciones musculares que se intensifican en relación a los estadios anteriores. Se sabe que en esta etapa el corazón comienza a adoptar la forma “C” (Guerrero, 2007). En el Estadio 33 (entre las 82 h – 90 hpf), la cola sobrepasa un poco la punta de la cabeza (Figura 49), mientras que en el Estadio 34 (90 h – 102 hpf) la cola se acerca al mielencéfalo.

3.1.6. Periodo de Eclosión

En los ejemplares recién eclosionados se han contado entre 50 – 55 somitos a lo largo del tronco, desde el final de la cabeza hasta el pedúnculo caudal. El saco vitelínico es ovoide y granular. El corazón late y las células sanguíneas pueden verse a través de los conductos de Cuvier y en la red circulatoria de la superficie ventral del saco vitelínico. Las fosas nasales son evidentes y los ojos se asemejan a dos manchas.

Estadio 35

Los primeros embriones eclosionados, **Estadio 35**, no presentan puntos de pigmento en los ojos; los rudimentos de las aletas pectorales son claramente perceptibles en algunos e indistinguibles en otros, y su sangre parece incolora (Figura 50).

Estadio 36

Los embriones que eclosionan en el Estadio 36, en la etapa de eclosión en masa, normalmente tienen un punto de pigmento en los ojos, y la sangre es roja. La boca y las hendiduras branquiales no están formadas todavía y la glándula de eclosión aún se distingue en algunos ejemplares (Figura 51).

Durante el período de eclosión, los embriones continúan creciendo dentro de las membranas hasta el momento en que se liberan, por lo que hay un aumento progresivo del tamaño de los mismos a medida que eclosionan. Al principio, eclosionan solo unos pocos embriones y luego el número de los que nadan en las botellas de incubación aumenta progresivamente, algunas veces aparecen embriones con malformaciones (Figura 52).

Figura 49. Embriones en **Estadio 33**, a partir de las 82 hpf, la cola sobrepasa un poco la punta de la cabeza, 12.5X



Figura 50. Embrión en **Estadio 35**, 16X.



Figura 51. Embrión en **Estadio 36**. El ojo (E) aparece bastante más pigmentado, se aprecia también la vesícula auditiva (AV) así como el color rojizo de la sangre en el corazón (Ht) y los vasos del saco vitelínico, 16X.

Figura 52. Embrión malformado. Aparece totalmente curvado con un desarrollo anormal de la membrana que lo envuelve impidiendo la separación entre el saco vitelínico y el tronco, 12.5X.



Se produce un proceso de distensión de la cubierta del huevo antes de la eclosión (Figura 53). El proceso de eclosión se inicia con la degeneración de la cubierta externa (Figura 53b a 53d) que deja al embrión rodeado únicamente por la membrana del huevo (Figura 54). Los embriones se mueven activamente dentro de las membranas, lo que permite que gradualmente consigan romperlas y salir. Algunas veces lo logran inmediatamente, mientras que otras nadan con parte de las membranas cubriéndoles la cabeza y el saco vitelínico hasta que por fin se liberan totalmente.

Cuando rompen la envuelta por la zona de la cabeza (Figura 54), empujan la membrana con la cola saliendo rápidamente. En otros casos, los movimientos más amplios de la región posterior del tronco y la cola permiten que se liberen fácilmente saliendo por la zona de la cola (Figura 55). En los casos en que la apertura de la membrana es pequeña, el saco vitelínico se deforma, tomando forma de pera o de ocho, aunque, una vez que el embrión ha eclosionado recupera su forma rápidamente (Figura 56).

A $17\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ la eclosión se produce a los 5 dpf, a las 120 hpf, mientras que a $15\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$, se produce a los 7 días y 18 hpf, (aproximadamente a las 186 hpf) considerando este momento como **Estadio 36** o de eclosión en masa (Tm: mass hatching). Aparecen algunos embriones eclosionados en las botellas entre 12 y 18 horas antes de la eclosión en masa (Te: **Estadio 35**). Los embriones tras la eclosión miden entre 7 y 11 mm.



Figura 53. Proceso de distensión de la cubierta externa del huevo antes de la eclosión: **a.** huevo con sus envolturas visto con luz transmitida; **b.** huevo con abombamiento en la cubierta; **c. y d.** dos fases de la degradación de la cubierta, 12.5X.

Figura 54. Embrión eclosionando por la parte de la cabeza, 8X.

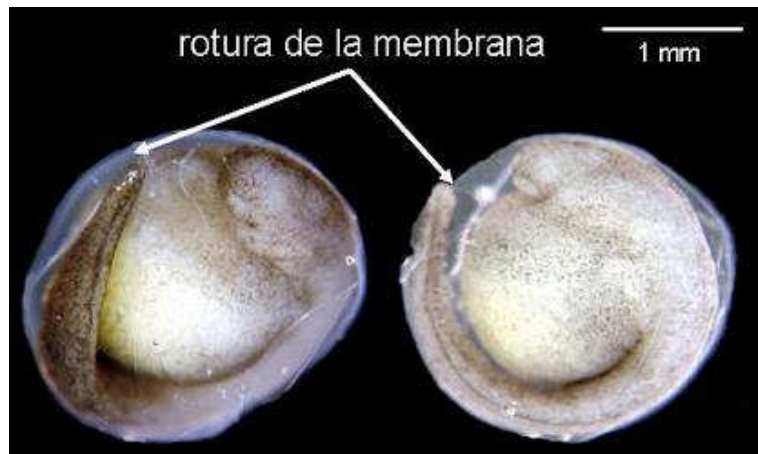


Figura 55. Rotura de la membrana por la cola, 12.5X.

Figura 56. Embrión con restos de membrana justo después de la eclosión, 16X.

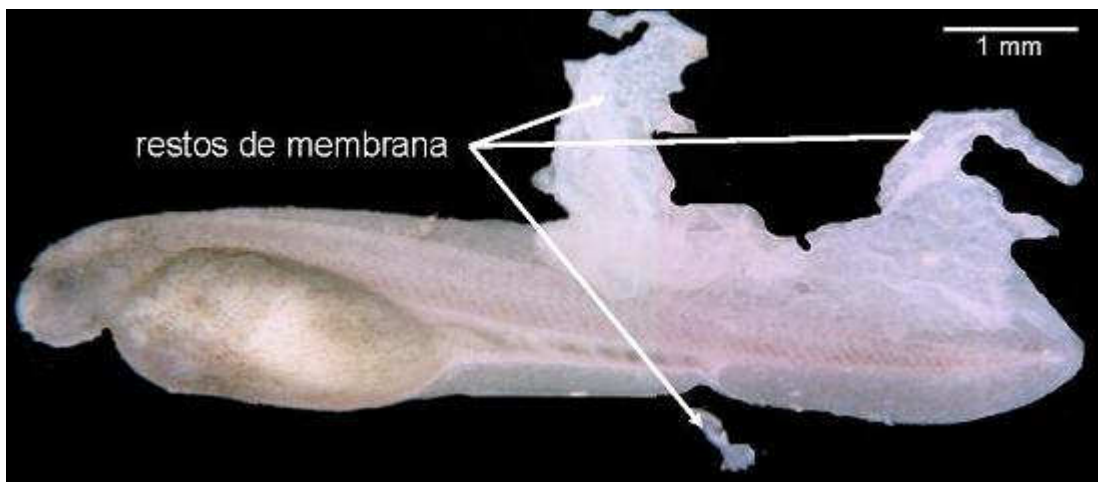


Tabla 4. Cronología del desarrollo embrionario en *Acipenser naccarii*, desde la fecundación hasta la eclosión

Periodos	Características del estadio (acontecimientos)	Estadios	Tiempo (horas, min y días) a T ^a =17°C (pf)	Tiempo horas, min, días a T ^a =15°C
Segmentación	Fecundación	1	0	
	Punto polar	2	20'	
	Luna creciente	3	1 h 20'	
	1 ^a división	4	1h 40'	
	2 blastómeros	4+	2h 20'	
	Comienzo 2 ^a división			
	4 blastómeros	5	2h 40'	
	8 blastómeros	6		
	Inicio 4 ^a división	6+	4 h	
	16 blastómeros	7		
	5 ^a división	8		
	7 ^a división	9	5 h 40'	
Blástula temprana	10	7 h 40'		
Blastocele	11	10 h		
Blástula tardía	12	16 h 10'		
Gastrulación	Inicio gastrulación	13	20 h 10'	
	Gastrulación temprana	14	21h 30'	
	Gastrulación media	15	24 h 10' (1d)	
	Tapón de vitelo aún con tamaño considerable	16	25 h	
	Tapón de vitelo se va reduciendo	16+	26 h	
	Tapón de vitelo pequeño	17	27 h	
	Gastrulación completada	18	32 h	
Neurulación	Neurulación temprana	19	33 h	
	Ampliación placa neural	20	34 h	
	Inicio unión pliegue neural	21	35 h	
	Neurulación tardía	22	36 h	
	El tubo neural se cierra	23	37 h	
Final neurulación– fusión placas laterales	Proceso formación de los ojos, sacos olfatorios, arcos viscerales	24	38 h – 43 h	
	Rudimento tronco y cola	25	44 h – 46 h	
	Unión placas laterales	26	47 h – 48 h (2 d)	82 h – 88 h
Fusión placas laterales–inicio de eclosión algunos embriones	Rudimento tubo corazón	27	49 h	88 h – 92 h
	Tubo corazón se alarga	28	52 h	
	Comienza a latir corazón	29	54 h – 56 h	96 h
	Cola se acerca corazón	30	56 h – 66 h	
	Punta cola toca el corazón, forma “S”, contracción activa	31	70 h – 76 h	
	La cola toca la cabeza	32	78 h – 80 h	
	Cola sobrepasa la cabeza	33	82 h – 90 h	
La cola toca el mielencéfalo	34	90 h – 102 h		
Eclosión	Comienzo eclosión (Te)	35	105 h	171 h
	Eclosión en masa (Tm)	36	120 h (5 d)	186 h (7d 18 h)

Tabla 5. Comparación del desarrollo embrionario (Estadios 1 – 36) de diferentes Acipenséridos y a distintas temperaturas.

ESTADIOS	Tiempo (pf = post fecundación) en horas y minutos			
	T ^a =17°C (<i>A. naccarii</i>)	T ^a 15 °C	T ^a =18°C (<i>A. gueldenstaedti</i>)	T ^a 15.7 °C <i>A. medirostris</i> <i>A. transmontanus</i>
1	0		0	0
2	20'		50'	
3	1 h 20'		1 h 40'	
4	1 h 40'		2 h 55'	6 h 10'
5	2 h 40'		3 h 45'	7 h 40'
6			4 h 35'	9 h 40'
7				10 h 30'
8			6 h 15'	10 h 57'
9	5 h 40'		7 h 30'	
10	7 h 40'		10 h	
11	10 h			17 h 55'
12	16 h 10'		12 h 30'	23 h 58'
13	20 h 10'		16 h 15'	27 h 15'
14	21h 30'		17 h 5'	31 h 35'
15	24 h 10' (1d)		22 h 55'	
16	25 h		25 h	41 h 45'
17	27 h		27 h 50'	45 h 25'
18	32 h		31 h 40'	47 h 25'
19	33 h		32 h 30'	48 h 30'
20	34 h		33 h 45'	49 h 25'
21	35 h		34 h 45'	52 h 50'
22	36 h		36 h 40'	55 h
23	37 h		37 h 30'	57 h 30'
24	38 h – 43 h			65 h 40'
25	44 h – 46 h			68 h 52'
26	47 h – 48 h (2d)	82 h – 88 h	50 h	
27	49 h	88 h – 92 h	53 h 20'	80 h 40'
28	52 h		57 h 30'	89 h 50'
29	54 h – 56 h	96 h		97 h 35'
30	56 h – 66 h		62 h 05'	
31	70 h – 76 h			
32	78 h – 80 h		78 h	145 h 35'
33	82 h – 90 h			154 h 05'
34	90 h – 102 h			161 h 50'
35	105 h	171 h	104 h – 106 h 40'	159 h 40'
36	120 h (5 d)	186 h (7d 18 h)		169 h
				176 h 40'
				155.9
				193.1

Tabla 6. Principales eventos que tienen lugar en *A. naccarii* desde el final de la neurulación hasta la eclosión.

Estadios desarrollo	Tiempo desde la inseminación		Características específicas del estadio
	17 °C	15 °C	
24	38–43 h		Formación de las tres vesículas primordiales del cerebro. Aparición del Pe, Me y Re. Aparecen los rudimentos de los ojos, sacos olfativos. Rudimentos de las vesículas auditivas. Primeros arcos viscerales A _I y A _{II}
25	44–46 h		Se reconoce la glándula de la eclosión (HG) Comienzo separación de la cola y parte final del tronco
26	46–48 h (2 dpf)	82–88 h	Se observa la cavidad del mielencéfalo (MyC) rudimento de la epífisis (PR)
27	49 h	96h (4 dpf)	Aparece un surco entre la cabeza y la superficie del saco vitelino Corazón como un tubo recto y corto, (Guerrero,2007) Se reconocen el esbozo pituitario. Latido inicial y débil, (Guerrero, 2007) El esbozo de la cola se ha separado de la superficie del cuerpo (fase bastón o barra) Los somitas se dibujan de manera clara en la región del tronco
28	52 h		La cabeza comienza a separarse del cuerpo
29	54–56 h	120h (5 dpf)	Los músculos del tronco comienzan a funcionar suavemente La cabeza aparece separada del saco vitelino (Guerrero, 2007) Orificio bucal bien dibujado. En la cabeza se distinguen las placas olfatorias, esbozos oculares, Pe, Re (Guerrero, 2007) El tronco y los somitas se hacen prominentes en el dorso del embrión. El corazón ha crecido en longitud se ha desviado hacia el lado derecho y ha adoptado la forma de “C” (Guerrero, 2007) A los lados de la cabeza se observan los tres primeros arcos branquiales. Se observan claramente los rudimentos del sistema excretor PT, PD y CD (Guerrero, 2007)
30	56–66 h		La punta de la cola del embrión se aproxima a la región pericárdica Se reduce el saco vitelino Comienza a separarse la región del tronco del saco vitelino La cabeza es más esférica con el desplazamiento relativo de los orificios olfativos, ojos,... El sistema excretor y la región de la cola se alargan El conducto excretor conecta con la cloaca Se observa como un esbozo el pliegue de la aleta (FF) ventral y dorsal
31	70–76 h (3 dpf)		La parte posterior del tronco y la cola se aplanan sobre sus lados y se curvan La punta de la cola alcanza gradualmente el corazón Los embriones se mueven dentro de las membranas
32	78 h		La punta de la cola alcanza la cabeza El embrión responde a estímulos, gira y voltea sobre sí mismo Los somitas se ven claramente a través de las membranas Se observa claramente el pliegue de la membrana de las aletas ventral y dorsal Las vesículas auditivas se observan a través de la piel
33	82–90 h		Los movimientos de la cabeza se hacen más evidentes Los movimientos, giros y volteos se intensifican y son más continuos La cola sobrepasa un poco la punta de la cabeza
34	90–102h (4 dpf)		La cola se acerca al mielencéfalo
35	105 h	171 h	Eclosionan los primeros ejemplares (Te) No presentan puntos de pigmentación en los ojos Se observan los rudimentos de las aletas pectorales en algunos La sangre parece incolora
36	120 h	7– 8 dpf	Se produce la eclosión en masa (Tm) Los embriones suelen presentar pigmentación en los ojos La sangre es rojiza Se distingue todavía la glándula de eclosión (HG) La boca se aprecia pero no está abierta



Láminas Desarrollo Embrionario (1-5)

Lámina 1. I. Periodo Segmentación – Blastulación
(Estadios 1 – 12)

Lámina 2. II. Gastrulación (Estadios 13 – 18)

Lámina 3. III. Neurulación (Estadios 18 – 23)

Lámina 4. IV. Final de la neurulación hasta la fusión de
las placas laterales (Estadios 23 - 26)

Lámina 5. V. Fusión de las placas laterales – eclosión
de los primero embriones (26 – 34)

Lámina 6. VI. Eclosión (35 - 36)

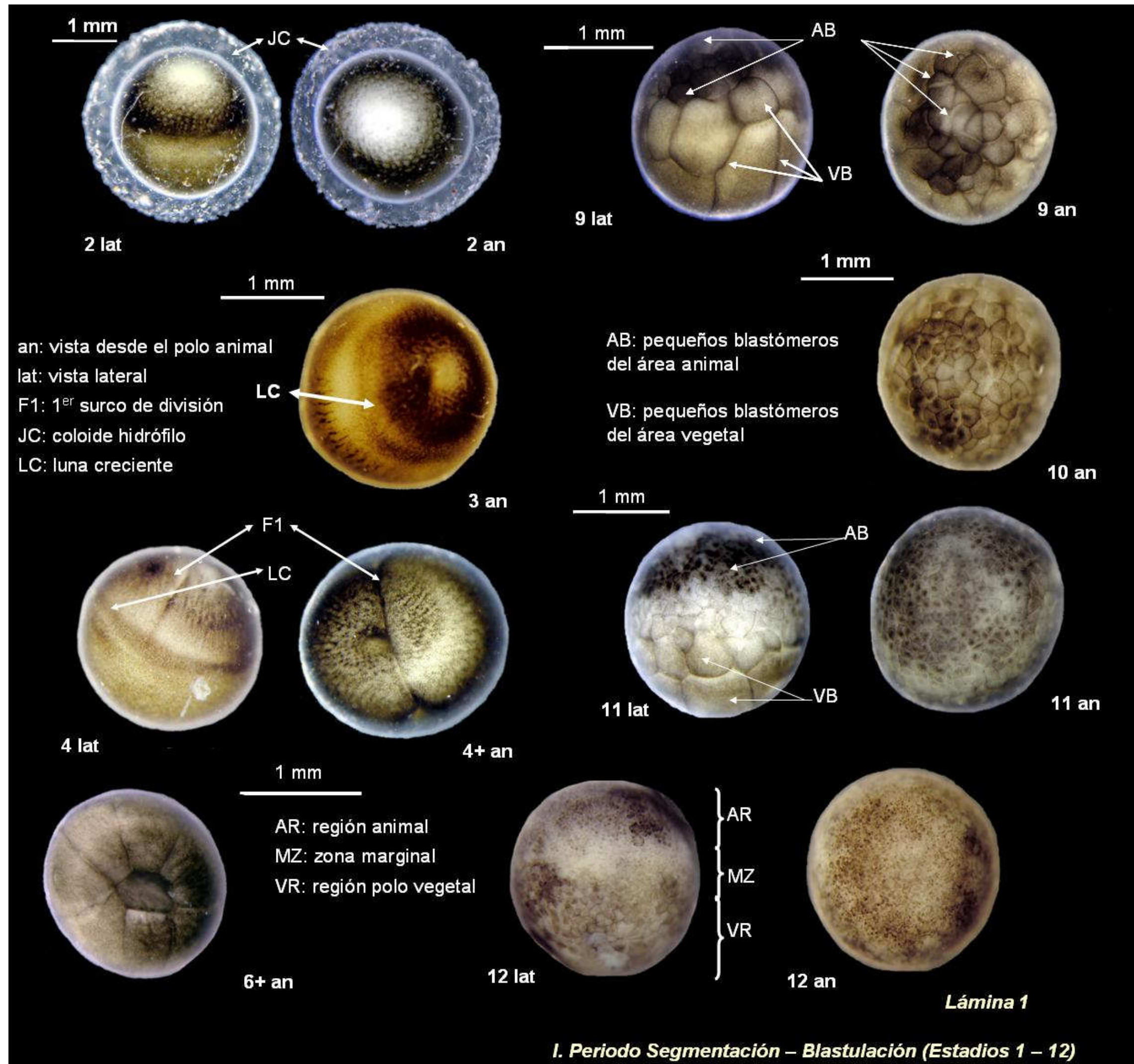
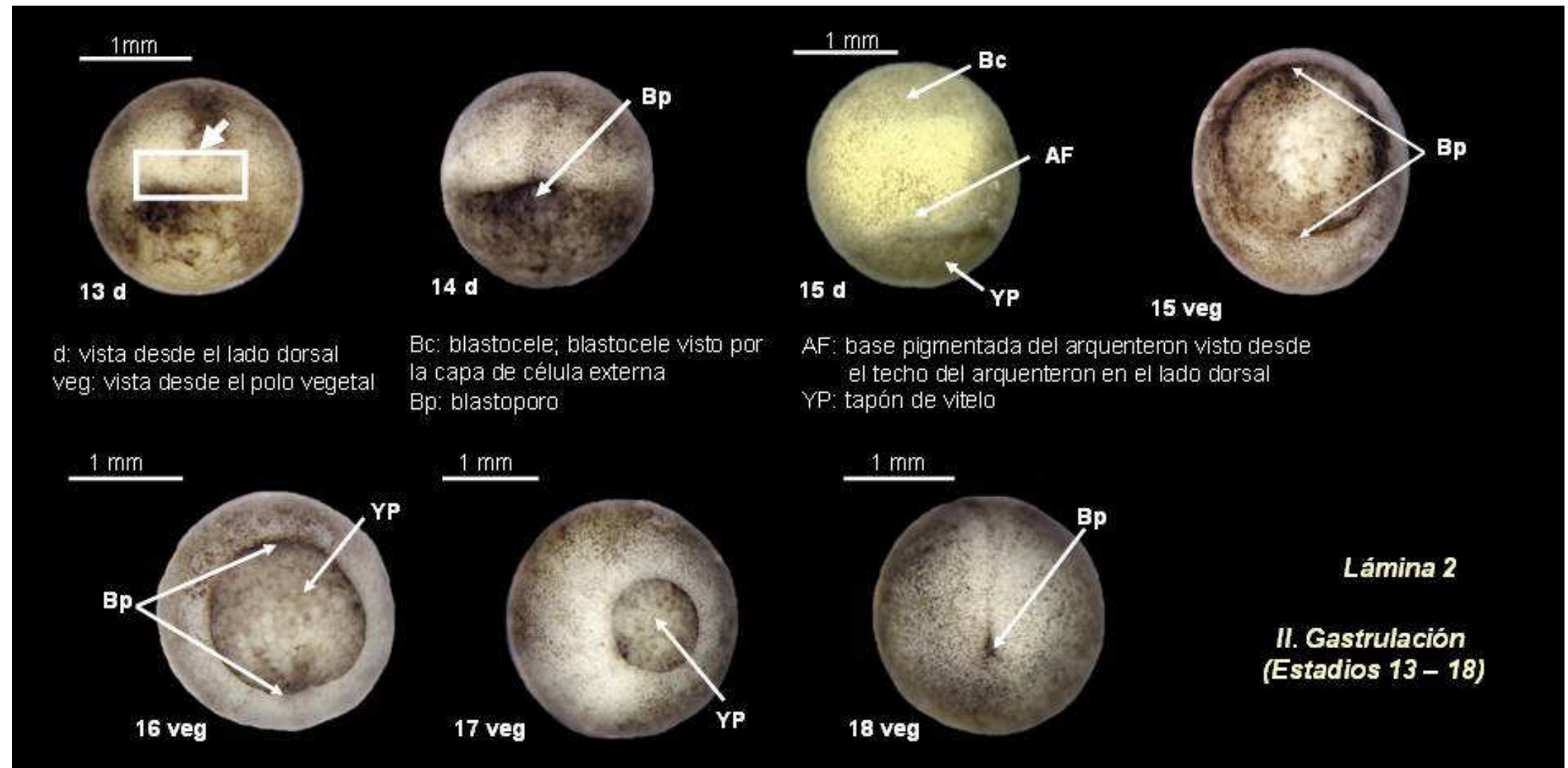
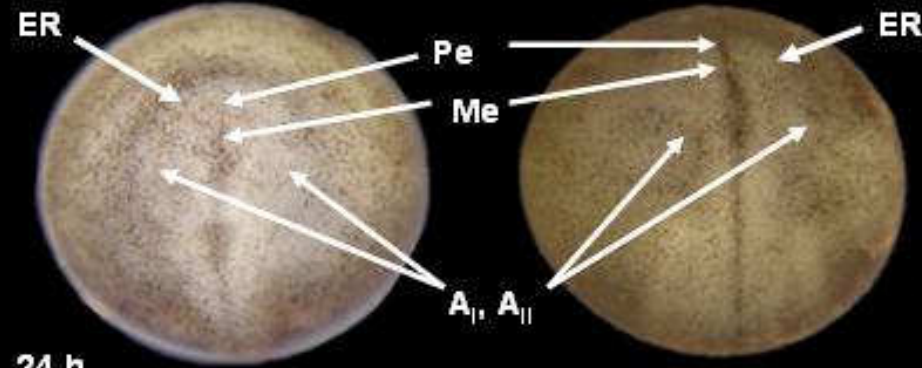


Lámina 1



Láminas 2 y 3

1 mm



24 h

24 d

1 mm

Área de la cabeza



25 d



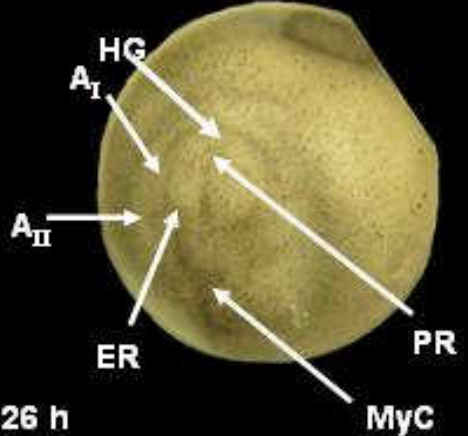
25 v



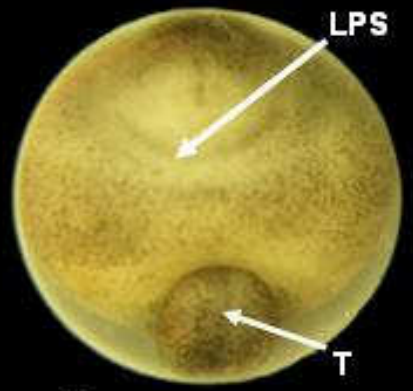
25 t

A_I, A_{II}: rudimentos del 1er y 2º par de arcos viscerales
 ER: rudimento del ojo
 Pe: prosencéfalo
 Me: mesencéfalo
 MyC: cavidad del mielencéfalo
 Re: rombencéfalo
 Ex: rudimento del sistema excretor
 HG: glándula de la eclosión
 LPS: punto polar claro
 PR: lugar de formación del rudimento de la pituitaria
 d: vista desde el lado dorsal
 h: vista desde el lado de la cabeza
 v: vista desde el lado ventral
 t: vista desde el lado de la cola
 lat: vista lateral
 T: cola

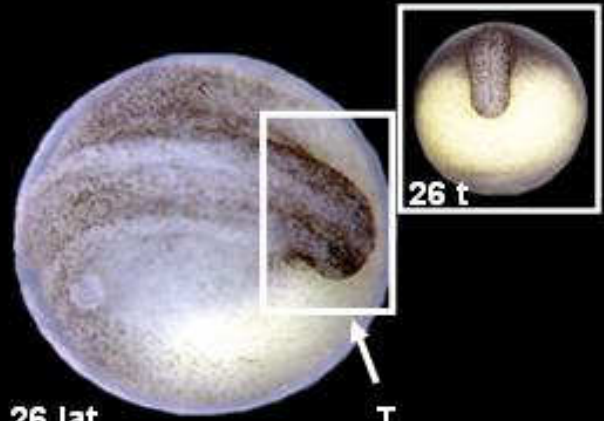
1 mm



26 h



26 v



26 lat

26 t

Lámina 4

IV. Final de la neurulación hasta la fusión de las placas laterales (Estadios 23 - 26)

Lámina 4

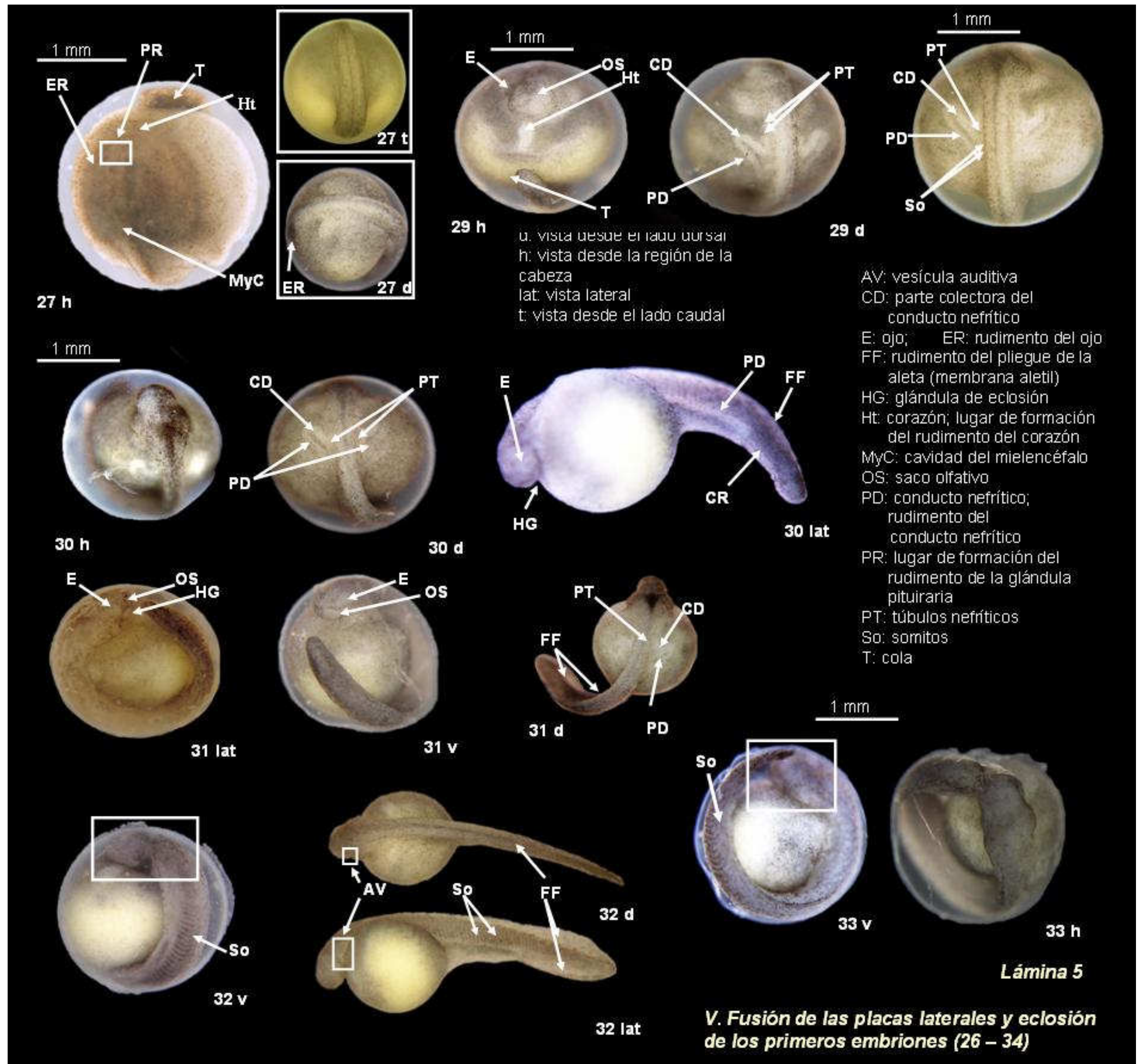


Lámina 5

Estadio 35

**Eclosión de los primeros
embriones (Te)**



Estadio 36

Eclosión en masa (Tm)

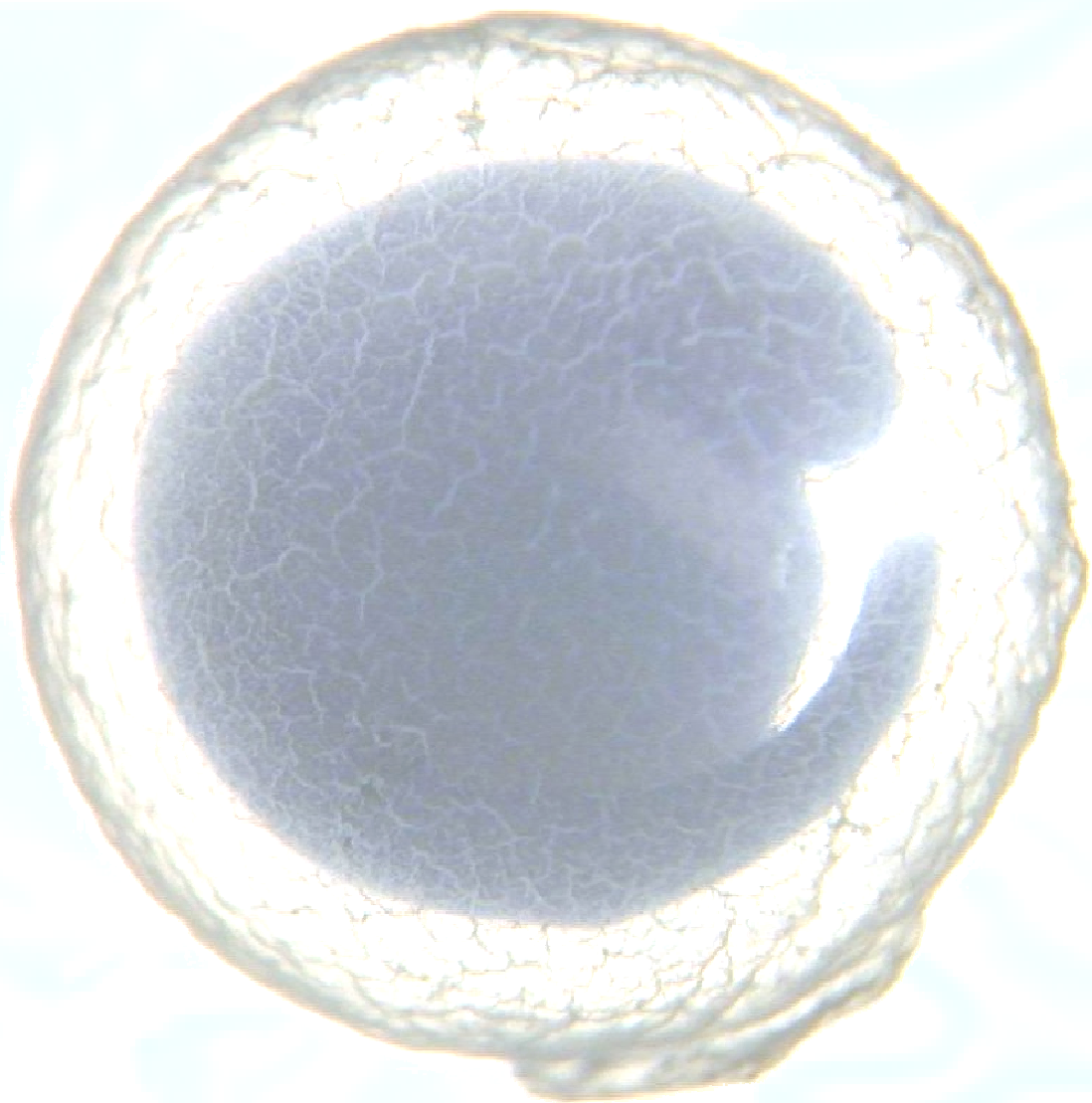


Te: eclosión de los primeros embriones

Tm: eclosión en masa

Lámina 6

VI. Eclosión (35 - 36)



3.2. Embrión de vida libre

3.2 Embrión de vida libre

El periodo de embrión de vida libre abarca desde la eclosión de los embriones, es decir, desde el momento en que estos salen de las membranas hasta la reabsorción de la totalidad del saco vitelínico y comienzo de la alimentación activa.

Cada etapa del desarrollo se ha caracterizado según los rasgos morfológicos distinguibles sobre el examen externo de los embriones de vida libre. En este punto, el intervalo de tiempo entre etapas consecutivas fue bastante largo, ya que se pretendía asociar a cada etapa una nueva fisonomía, es decir, se han considerado los cambios a nivel morfológico de los rasgos que aparecieron durante las distintas etapas.

El inicio de cada estadio se consideró como el momento en que al menos el 50 % de los embriones mostró los rasgos característicos de éste.

Estadio 36 (Dettlaff & Ginsburg, 1954): Eclosión en masa (Tm)

Los embriones presentan una longitud entre 9.45–10.75 mm. La glándula de la eclosión se distingue y es visible bajo la invaginación de la boca que todavía es un esbozo. La cabeza es pequeña en relación con el tronco y está algo arqueada hacia el saco vitelínico que tiene forma alargada ovoide más ancha en su parte anterior.

El tronco y la cola se encuentran bordeados por el pliegue de la aleta, al que hemos llamado membrana aletil, (FF). El pliegue de la membrana muestra la misma anchura superior e inferior, es decir, la cola en esta etapa es protocerca.

Se localiza el rudimento de la cloaca entre las áreas preanales y postanales del pliegue de la aleta; estas partes se separan la una de la otra por un pequeño surco. El pliegue de aleta preanal comienza detrás del saco vitelínico y en la zona adyacente a éste, es más ancha. El pliegue de la aleta dorsal se estrecha hacia la cabeza y desaparece en el nivel al que comienzan los segmentos de los músculos anteriores (Figuras 57 y 58).

En esta etapa la segmentación de los músculos de tronco ya se ha completado. Hay entre 36 y 38 segmentos de músculo hasta el rudimento de la cloaca. La segmentación de los músculos de la cola es incompleta y la parte posterior del mesodermo aún no está segmentada. El extremo final de la notocorda en algunos individuos se muestra ligeramente doblado hacia arriba.

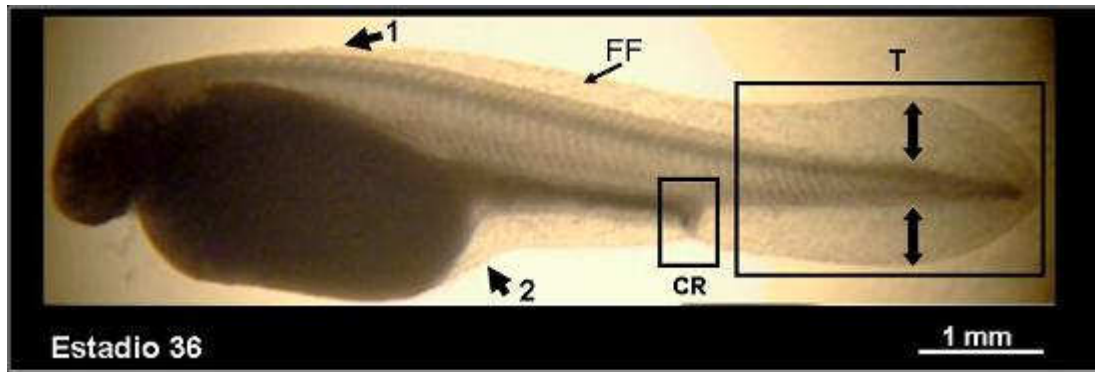


Figura 57. Embrión de vida libre en **Estadio 36**, donde se aprecia claramente la cabeza más pequeña en relación al saco vitelínico bastante redondeado, más ancho en su parte anterior. La válvula espiral desemboca en el rudimento de la cloaca (**CR**) entre los pliegues preanal y postanal. El pliegue de la aleta (**FF**) (membrana aletil), bordea todo el embrión desde la parte posterior de la cabeza (**1**), muy reducido hasta el saco vitelínico (**2**) más ancho. La cola es protocerca (**T**) ya que la notocorda aparece recta y la anchura del pliegue tanto superior como inferior es la misma, 10X.

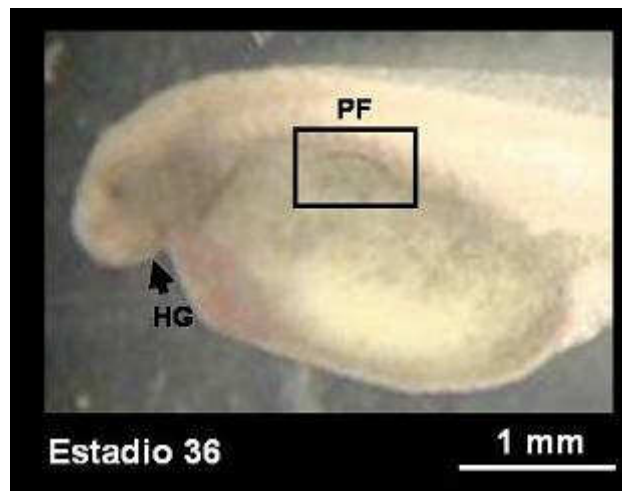


Figura 58. Detalle zona anterior de un embrión de vida libre en el **Estadio 36**, donde puede apreciarse la glándula de eclosión (**HG**), y el primer indicio de formación de la aleta pectoral (**PF**), 8X.

En cuanto a la pigmentación, es muy débil, hay poca cantidad de melanina en las células epidérmicas por lo que muestran un aspecto bastante pálido a excepción de la región del saco vitelínico. En su parte posterior, discurre una red de capilares mientras que en la anterior los vasos se unen formando un par de venas, cerca de los conductos de Cuvier que abren al corazón. La sangre tiene color rojo, por la presencia de hematíes.

La pigmentación en los ojos es muy leve, en algunos individuos son inapreciables. Los órganos sensoriales están débilmente desarrollados.

Estadio 37

Los embriones de vida libre miden entre 10.40 y 11.60 mm. Es posible observar algunos restos del pigmento embrionario conservado en la epidermis. (Figura 59).



Figura 59. Embrión de vida libre en **Estadio 37**, donde se aprecia cómo la cabeza comienza a enderezarse, el saco vitelínico está menos redondeado y la cola se estiliza. En la parte ventral anterior destaca la presencia del “corazón” que aparece como una mancha translúcida roja a la luz, 8X.

Este estadio transcurre entre 1 y 2 dpe, tiene una duración aproximada de 36 horas, se caracteriza porque la boca comienza a abrirse camino en la parte media de la cabeza, que comienza a enderezarse muy lentamente. La boca comienza a abrirse hacia la mitad del 2 dpe concluyendo la apertura el 3 dpe, y la diferenciación de esta en dos valvas orales (Llorente, 2006) entre este estadio y el siguiente.

Los rudimentos de las barbillas se localizan cerca del límite de la parte anterior de la boca, comienzan a aparecer como dos estructuras globulares que a su vez se subdividen en otras dos exteriores más pequeñas (Figura 60).

Se pueden distinguir los rudimentos de las aletas pectorales (PF), que parecen como abultamientos, apenas sensibles, de las pieles localizadas sobre el saco vitelínico inmediatamente detrás de los conductos excretores y la parte superior de los conductos de Cuvier. También se aprecia el primer par de hendiduras branquiales (Figura 61).

El saco vitelínico cambia su forma, ahora es algo más alargado y su superficie ventral menos convexa. La parte más ancha del saco vitelínico se subdivide en dos regiones y, en este momento, la distancia entre la red de vasos y los conductos de Cuvier se incrementa. La válvula espiral se diferencia claramente, desembocando en la cloaca (Figura 62). La cola se alarga y estiliza en comparación con la parte anterior del tronco (Figura 63).

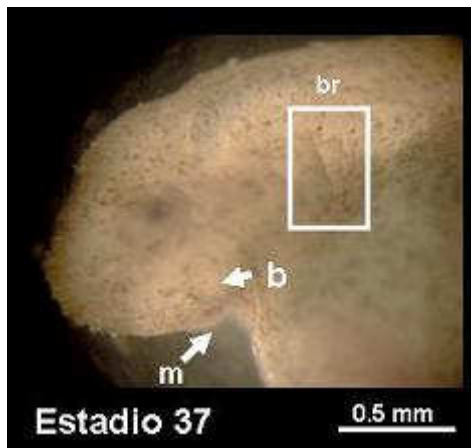


Figura 60. Detalle de la cabeza de un embrión en **Estadio 37**, donde **(b)** muestra los primeros indicios de la formación de los rudimentos de las barbillas, **(br)** rudimento del surco branquial y **(m)** lugar de apertura de la boca, 40X.

Figura 61. Detalle de la parte anterior de un embrión de vida libre en **Estadio 37** donde se localiza **(br)** primer par de hendiduras branquiales (surco branquial) y **(PF)** la aleta pectoral, 32X.

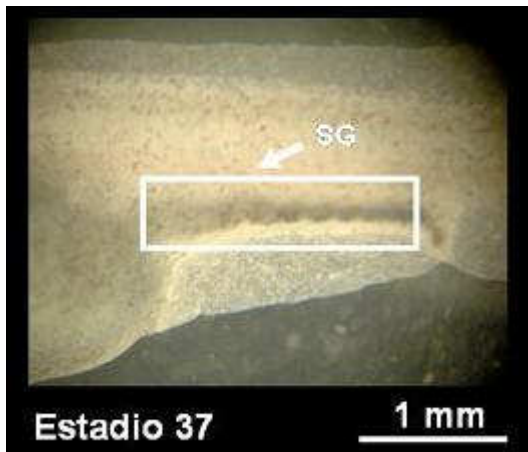
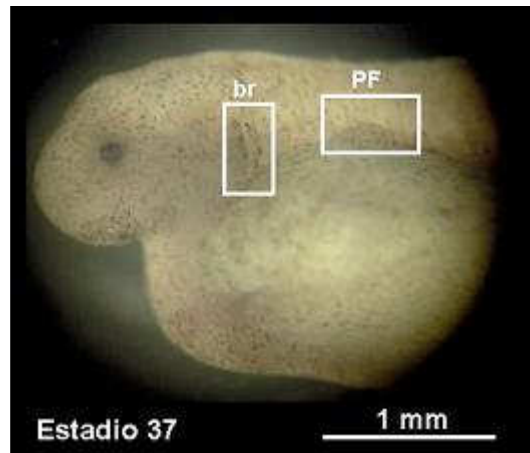
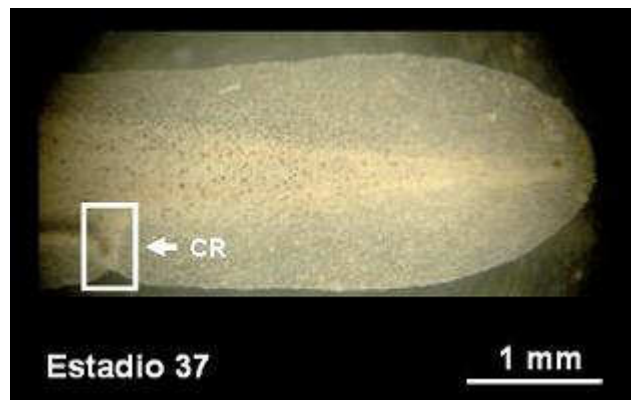


Figura 62. Detalle de la válvula espiral **(SG)** de un embrión de vida libre en **Estadio 37**, 20X.

Figura 63. Detalle de la zona caudal de un embrión de vida libre en **Estadio 37**, donde se puede observar, enmarcado en blanco, el rudimento de la cloaca **(CR)**. También se aprecia la existencia de una leve pigmentación de la zona, 20X.



Estadio 38

Este estadio ocupa la segunda mitad de los 2 dpe y la primera mitad los 3 dpe (2-3 dpe), aproximadamente unas 18 horas. La longitud de los embriones oscila de 11.50 a 12.90 mm, la pigmentación aumenta respecto al estadio anterior, se observan melanocitos dispersos sobre la epidermis en la superficie de la cabeza, que son similares a los que se encuentran sobre el lado dorsal de los primeros segmentos de músculo del tronco, sobre los segmentos de músculo y del pliegue de la aleta, en la zona de la futura aleta dorsal.

El extremo final de la notocorda está ligeramente doblado hacia arriba. En la región de la aleta dorsal comienzan a distinguirse los rudimentos los primordios musculares y también aumenta la pigmentación. Apenas se distinguen los rudimentos de los primordios musculares en el nivel de la futura aleta anal (Figura 64).

El pliegue opercular y el primer arco branquial presentan cada uno de ellos una fila de rudimentos cortos de filamentos branquiales. Los orificios olfativos se alargan ligeramente (Figura 65). Comienza la pigmentación del iris.

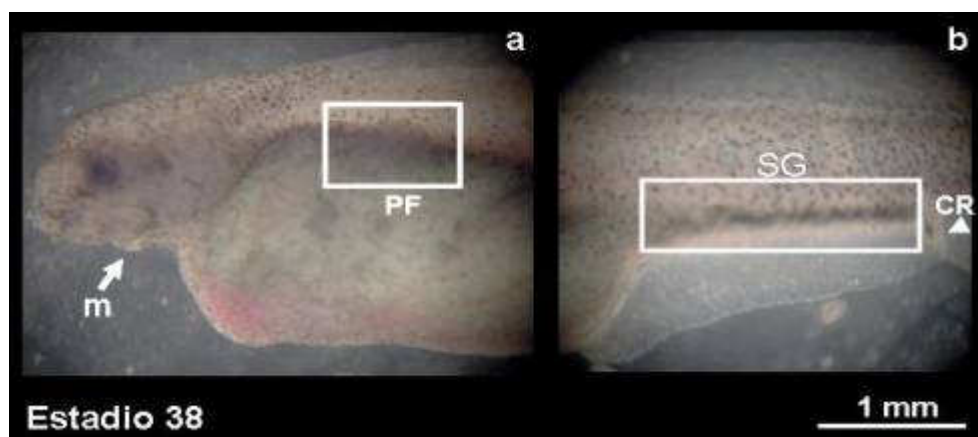
La región ventral del cuerpo está aplanada lateral y ventralmente. La anchura de los segmentos musculares aumenta. La aleta pectoral se distingue, más transparente y redondeada, por encima del saco vitelínico (Figuras 66a y 66b).



Figura 64. Embrión de vida libre en **Estadio 38**, donde se aprecia como la cabeza está más enderezada, el saco vitelínico presenta varias partes y ha aumentado la pigmentación en las regiones troncal y caudal, 10X.



Figura 65. En la foto de la izquierda se puede apreciar la vista dorsal de la cabeza de un embrión de vida libre en **Estadio 38**, se observa pigmentación aunque los melanocitos aparecen aún dispersos. En la foto de la derecha se muestra la vista ventral de la cabeza, se observan los filamentos branquiales (**brf**), asomando levemente por debajo del opérculo. Se ve claramente la boca y justo por encima de esta y hacia los lados dos abultamientos relativamente gruesos (**b**), rudimento de las barbillas. Señaladas con un rectángulo, se observan por transparencia las narinas, 32X.



Figuras 66a y 66b. Se observa el saco vitelínico más alargado y se distingue, en tono rojo, la región perteneciente al corazón. La zona señalada como (**m**) pertenece a la boca, la encuadrada como (**PF**) es la aleta pectoral y en la foto de la derecha se observa encuadrada la válvula espiral (**SG**) y señalada con una flecha la región de la cloaca (**CR**), 25X.

Estadio 39

Transcurre dentro de los 3 dpe con una duración aproximada de 12 horas. La longitud de los embriones se encuentra entre 12.40 y 13.80 mm. Su pigmentación es notablemente más intensa sobre todo en la región caudal. Los melanocitos son más oscuros y se extienden por toda la superficie del cuerpo y los segmentos de los músculos de la cola (Figura 67).

Esta etapa se caracteriza porque en la región de la cabeza, en los extremos de la boca, se forman unos pequeños pliegues que son los rudimentos del labio inferior. El rudimento del labio superior se subdivide en dos partes. Los esbozos de los dientes también aparecen (Figura 68), aunque el proceso de diferenciación de los gérmenes dentarios, que comienza con el engrosamiento y la posterior evaginación de parte del epitelio bucal, ocurre hacia los 2 dpe para formar la lámina dental (Llorente, 2006).

Se abre la segunda hendidura branquial y aparecen los rudimentos de los filamentos branquiales sobre el pliegue del opérculo y los de la primera fila de branquiespinas se alargan ligeramente aunque todavía son cortos.

El saco vitelínico se subdivide en varias regiones claramente visibles desde el exterior (Figura 69), a consecuencia de la división del rudimento del sistema digestivo que se divide en dos regiones (Llorente, 2006). Se observa claramente la red vascular del saco vitelínico y la coloración roja de las células sanguíneas (Figura 69). La segmentación de los músculos de la región ventral casi alcanzan el borde más bajo del opérculo. Las aletas pectorales aumentan su tamaño y se desplazan un poco hacia abajo.

En la región caudal, el pliegue de la membrana aletil (FF) se ensancha para dar lugar al rudimento de la aleta dorsal, y comienza a extenderse en la región de la aleta anal y del lóbulo inferior de la aleta caudal. La aleta caudal se va separando de las aletas dorsal y anal por unos estrechamientos que se van produciendo como escotaduras tanto en la parte dorsal como en la ventral. Se observan claramente los primordios musculares de las regiones dorsal y anal (Figura 70). La pigmentación de las zonas dorsal y anal se hace cada vez más oscuras quedando marcadas claramente.



Figura 67. Embrión de vida libre en **Estadio 39**. En la cabeza se aprecia como comienzan a sobresalir las barbillas (**b**). En la membrana aletil (**FF**) se observa la segregación de la aleta dorsal (**DF**) y la escotadura (**esc**) que dará lugar a la aleta anal, 8X.

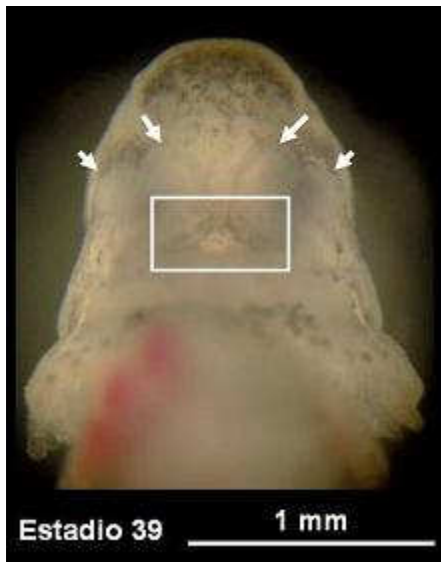


Figura 68. Vista ventral de la región de la cabeza de un embrión en **Estadio 39**, donde se aprecian, señaladas con cuatro flechas, las barbillas que presentan forma globular y, encuadrada en blanco, la región de la boca y zona de los labios. Los tres puntos rojos separados que se aprecian a la izquierda son los arcos branquiales, 40X.

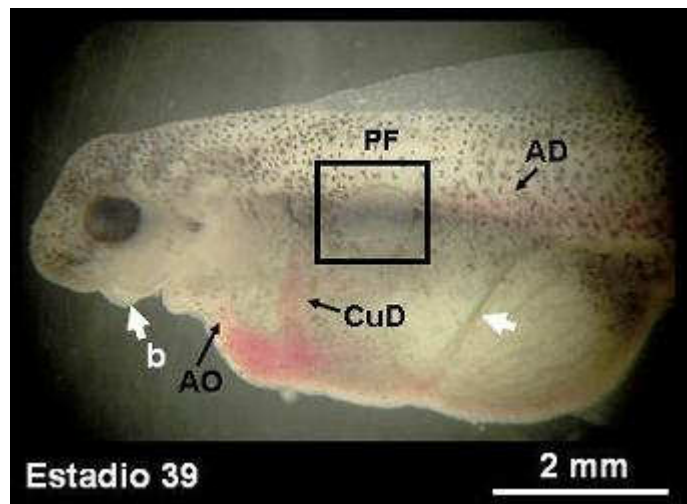
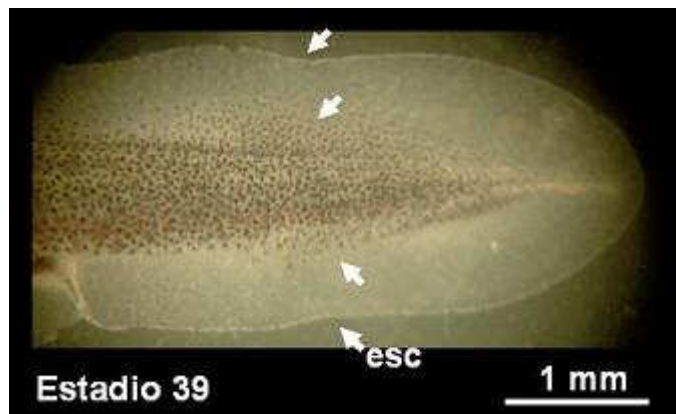


Figura 69. Vista lateral de un embrión en **Estadio 39** donde se aprecian las características descritas anteriormente y donde se han señalado, la zona de las barbillas (**b**), la aleta pectoral (**PF**), y justo detrás de ésta y por encima del saco vitelínico observamos la arteria dorsal (**AD**), el conductos de Cuvier (**CuD**) y por delante al arco aórtico (**AO**). 12.5X.

Figura 70. Región caudal de un embrión de vida libre en **Estadio 39**, donde se ve, en la parte interior cómo aumenta la pigmentación en torno a la región de la aleta dorsal y anal. En la zona más exterior se observa cómo se van pronunciando las escotaduras (**esc**) que separarán la aleta caudal de las aletas dorsal y anal.



Estadio 40

Este estadio ocupa el final del 3 dpe y el principio del 4 dpe (3 – 4 dpe), con una duración aproximada de 12 horas. Los embriones alcanzan una longitud de entre 13.50 y 14.50 mm de largo. La pigmentación aumenta. Los melanocitos aparecen agrupados a ambos lados del mesencéfalo y la parte anterior del mielencéfalo, sobre el lado dorsal de los segmentos anteriores de los músculos y sobre el límite entre los músculos axiales y ventrales, cerca de las aletas pectorales. Sobre el pliegue de la membrana aetil se observan melanocitos dispersos que se concentran en la zona de la aleta dorsal y a lo largo de la zona de la parte posterior del tronco y de la cola (Figura 71).

Los rudimentos de las barbillas se alargan. El iris se distingue bien por su color marrón claro. Los primeros y segundos filamentos branquiales se alargan, los primeros alcanzan el nivel de los conductos de Cuvier, observándose claramente por debajo del opérculo. La cabeza comienza a separarse del cuerpo. En posición ventral se aprecian los rudimentos de los tres primeros arcos aórticos (Figuras 72 y 73).

La base de la aleta pectoral casi alcanza la parte media de la superficie lateral del estómago (Figura 74). Comienzan a observarse primordios musculares.

Esta etapa se caracteriza también porque aparecen los rudimentos de las aletas ventrales, y lo hacen como pliegues longitudinales y estrechos sobre el pliegue preanal. Además se producen los primeros indicios de la reducción del pliegue anterior de la aleta preanal aunque de forma muy débil (Figura 75).

El lóbulo inferior de la aleta caudal parece seguir ampliándose al aumentar la escotadura ventral. La aleta dorsal aumenta de tamaño. La pigmentación de los músculos, por debajo de ésta, es más evidente tal y como se aprecia en la (Figura 76).



Figura 71. Vista general, embrión de vida libre en **Estadio 40**, donde se observa la aleta pectoral (PF), encuadrada en blanco, (DF) indica la aleta dorsal y (esc) la escotadura que separará la aleta caudal de la anal 12.5X.



Figuras 72 y 73. En la foto de la izquierda, se aprecian las cuatro barbillas perfectamente segregadas (b), los labios (l) superiores hasta la comisura y las branquias (br) más alargadas que asoman por debajo del opérculo, así como los arcos branquiales, 32X. En la foto de la derecha se aprecia un detalle de la cabeza, donde claramente se ve el ojo con el iris (i) y también el perfil de las barbillas (b). Encuadrada en blanco se aprecian el opérculo y las branquias, 25X.

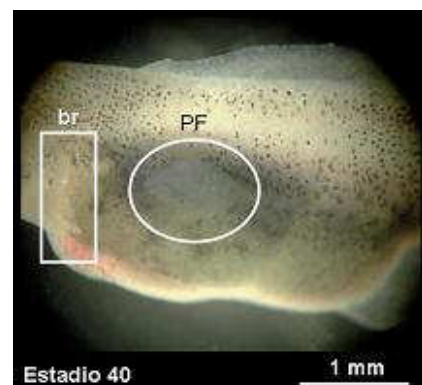


Figura 74. Detalle de las branquias (br), que sobresalen de la hendidura branquial en el rectángulo y de la aleta pectoral (PF) señalada con una elipse, en un embrión en **Estadio 40**, 25X.

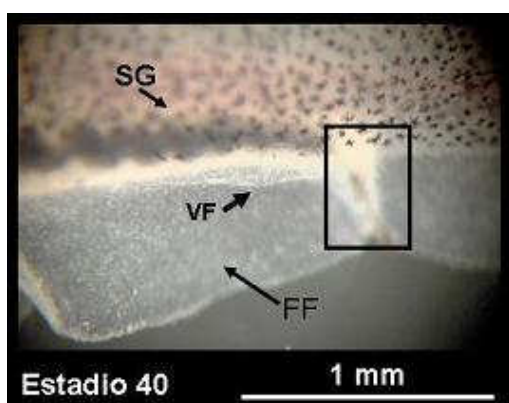


Figura 75. Embrión de vida libre en **Estadio 40**, detalle del rudimento de la aleta ventral (VF) sobre el pliegue de la membrana aletal (FF) por debajo de la válvula espiral (SG) e indicado con una flecha y la cloaca encuadrada en negro, 40X.

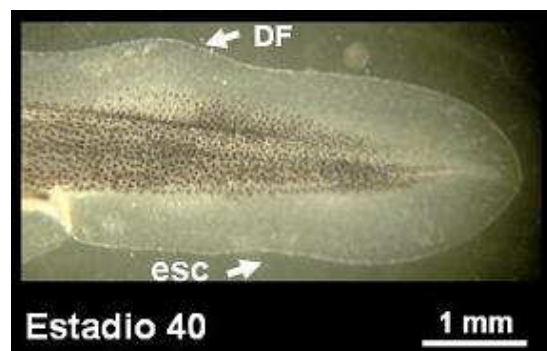


Figura 76. Embrión de vida libre en **Estadio 40**, detalle de la región de la cola donde se aprecia un incremento generalizado de la pigmentación así como la aleta dorsal (DF), que aumenta de tamaño. La escotadura (esc) que separará la aleta caudal de la anal se hace más pronunciada, 12.5X.

Estadio 41

Transcurre dentro del 4 dpe, aproximadamente su duración es de 18 horas. Los embriones tienen una longitud entre 14.20 y 15.70 mm de largo. La pigmentación es bastante evidente y marcada a lo largo de todo el embrión principalmente en su zona dorsal y en los flancos.

El iris es más oscuro. La base de las aletas pectorales toma una posición oblicua respecto al eje longitudinal del cuerpo. La línea lateral sobrepasa las aletas pectorales y casi llega al nivel donde comienza la válvula espiral (Figura 77).



Figura 77. Vista general de un embrión de vida libre en **Estadio 41**, donde se observa señalada con una flecha la línea lateral (**LL**), 8X.

Los filamentos branquiales se abren camino entre la segunda y tercera branquia. La segunda fila de filamentos se forma sobre la segunda branquia y comienzan a formarse en el tercer arco branquial (Figuras 78 y 79).

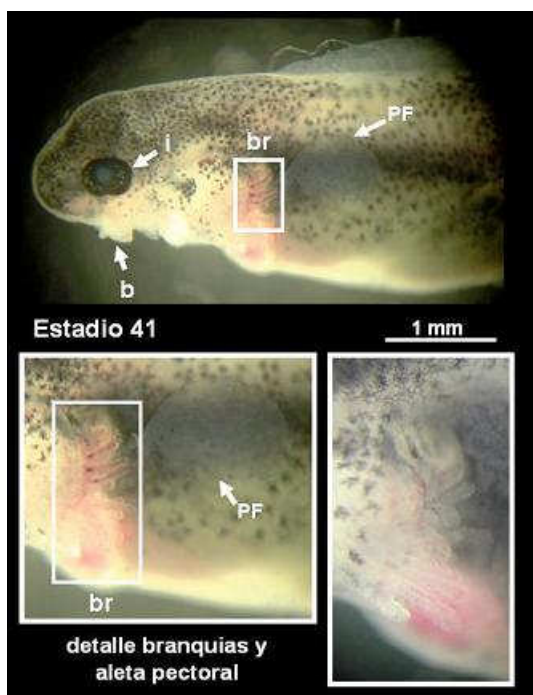
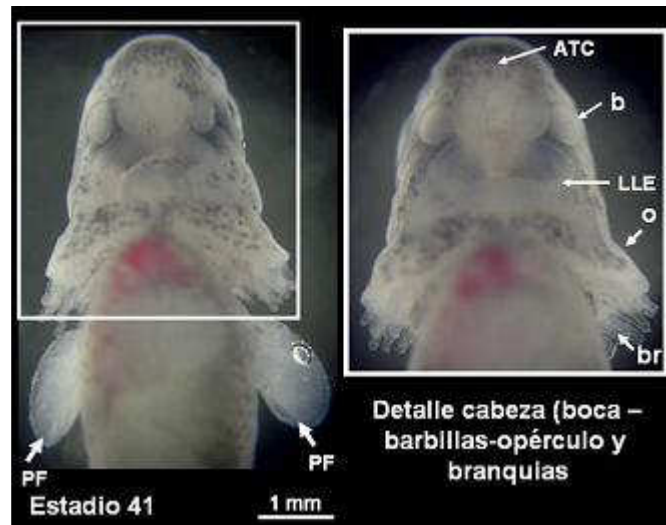


Figura 78. Se puede observar la parte anterior de un embrión de vida libre en **Estadio 41**, las barbillas (**b**) sobresalen claramente en el perfil, el iris (**i**) adquiere una coloración más oscura, las branquias (**br**) se alargan y sobresalen del opérculo y la aleta pectoral (**PF**) adquiere una posición oblicua, 20X.

Las barbillas se enderezan. Aparecen los primeros botones gustativos sobre los extremos de las barbillas. Según Llorente (2006) los esbozos de los botones gustativos aparecen en las barbillas entre el 3 y 4 dpe y al 5 dpe, un día después, en los labios. El labio

superior se endurece en su parte media. Se distinguen los cortos lóbulos laterales del labio inferior (LLE) (Figura 79).

Figura 79. Parte anterior ventral y detalle de la cabeza de un embrión de vida libre en **Estadio 41**, donde se aprecia que las aletas pectorales toman una posición oblicua, 20X, y la zona ampliada de la cabeza donde se diferencian claramente varias zonas: zona del morro donde se encuentran: (ATC) comisura transversal anterior, (b) barbillas, (LLE) borde del labio inferior que está interrumpido, (o) opérculo y (br) branquias, 32X.



Las aletas pectorales adquieren una posición oblicua (Figuras 78 y 79).

En cuanto a las aletas anal y ventral, el pliegue de la aleta preanal se reduce y la parte posterior de las aletas ventrales se ensancha (Figura 80).

El extremo posterior del cuerpo se curva suavemente hacia arriba. Los segmentos de los músculos ventrales experimentan un crecimiento importante sobre la superficie lateral del cuerpo (Figura 81).

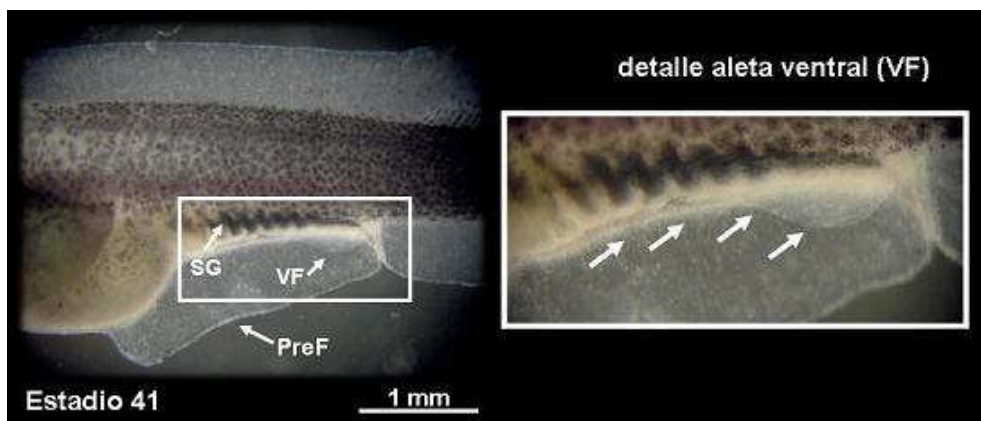
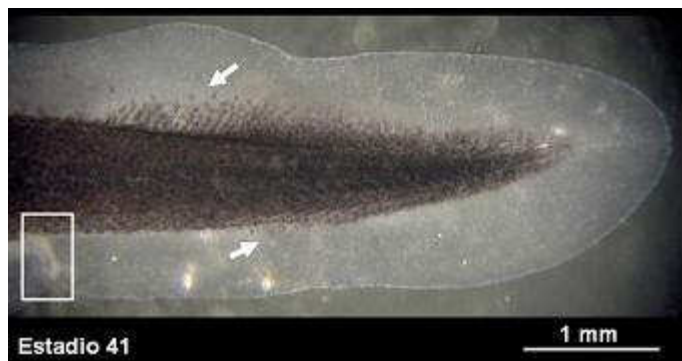


Figura 80. Detalle de las aletas preanal (PreF) y ventral (VF) en un embrión de vida libre en **Estadio 41**, por debajo de la válvula espiral (SG), 20X.

Figura 81. Zona caudal de un embrión de vida libre en **Estadio 41**. El extremo final del cuerpo se alarga y se dobla hacia arriba. Las flechas señalan los segmentos de músculo en la zona de la aleta dorsal y anal. La cloaca aparece enmarcada en blanco, 20X.



Estadio 42

Tiene lugar el 5 dpe con una duración aproximada de 18 horas. Los embriones miden de 15.50 a 16.50 mm. Los melanocitos aparecen sobre la parte inferior del opérculo y también en la zona anterior de la región ventral. Los embriones muestran todavía el morro muy corto (Figura 82).

Las barbillas continúan poniéndose derechas y alargándose. En la boca se distinguen claramente los labios y los rudimentos de los dientes. Las papilas gustativas aparecen sobre los labios, 5 dpe (Llorente, 2006). Los rudimentos de los primeros filamentos branquiales del tercer arco branquial son claramente perceptibles por debajo del opérculo. En las aletas pectorales se distinguen claramente los primordios musculares (Figura 83).

La aleta pectoral desciende hacia la zona media de la superficie lateral del embrión y se desplaza hacia adelante. Su borde anterior se encuentra a la misma altura que los filamentos branquiales (Figura 84).

El pliegue de la aleta preanal sigue estrechándose. Las aletas ventrales, sin embargo, cambian su forma, ahora no son tan redondeadas sino que presentan un lóbulo en su parte posterior que aún no alcanza el borde del pliegue de la aleta preanal. Los primordios musculares comienzan a distinguirse en la base de las aletas ventrales. La aleta caudal se alarga y apenas presenta cambios respecto al estadio anterior (Figura 85).



Figura 82.
Vista
general de
un embrión
de vida libre
en **Estadio
42**, 8X.

Figura 83. Foto de la zona anterior ventral de un embrión de vida libre en **Estadio 42**, donde en la imagen de la izquierda se observan las yemas de los músculos (**y**) de las aletas pectorales (**PF**), 20X, y en la foto de la derecha se amplía la cabeza, donde se diferencian las barbillas (**b**), la zona de la boca, donde se distinguen los labios, el borde del labio inferior (**LLE**), en el rectángulo blanco y señalado con una flecha se aprecian los esbozos de los dientes. También se pueden ver las branquias (**br**) que sobresalen de los diferentes arcos branquiales y asoman a través del opérculo (**o**), 32X.

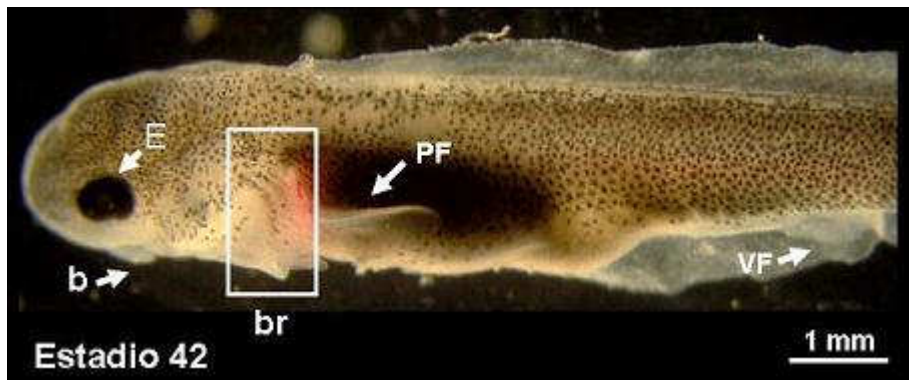
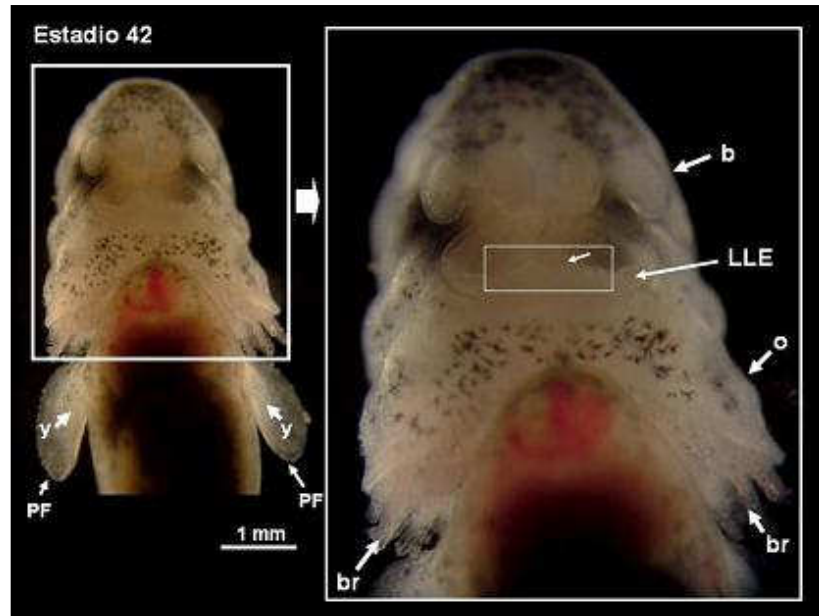
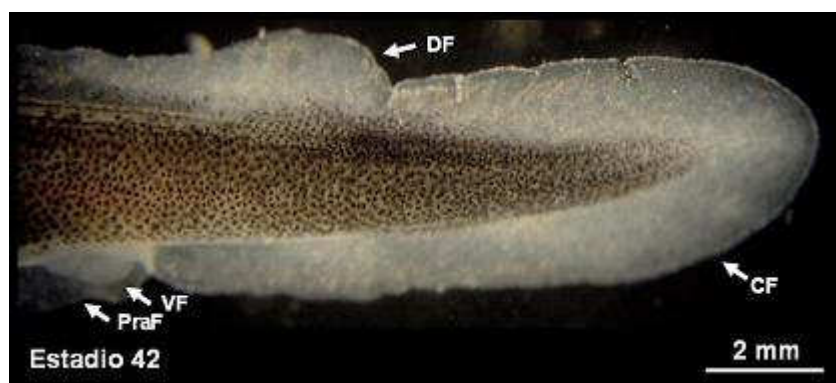


Figura 84. Zona anterior de un embrión de vida libre en **Estadio 42**. Desde la cabeza se observa el ojo (**E**), el perfil de una de las barbillas (**b**), las hendiduras branquiales (**br**) y la aleta pectoral (**PF**) más separada del cuerpo y la aleta ventral (**VF**) acercándose al borde de la aleta preanal, 12.5X.

Figura 85. Porción final de un embrión de vida libre en **Estadio 42** donde se diferencian las distintas aletas, dorsal (**DF**), caudal (**CF**), ventral (**VF**) y preanal (**PraF**), 12.5X.



Estadio 43

Transcurre entre el final del 5 dpe y el principio del 6 dpe ocupando aproximadamente 12 horas. Los embriones miden entre 16 y 17 mm de largo. El morro toma la posición horizontal (Figura 86).

Las barbillas adquieren una posición más horizontal. Los ojos están claramente más definidos, muestran un iris amarillento en el centro y en su borde final es negro.

La cuarta hendidura branquial se abre paso a través del opérculo que cubre el margen anterior de la aleta pectoral. En cuanto a las aletas pectorales, sus lóbulos se ensanchan. Éstas muestran una forma más redondeada y además se van separando del cuerpo y colocándose perpendicular a éste. El rudimento pilórico (PAR) comienza a subdividirse en lóbulos pudiendo apreciarse desde el exterior. (Figuras 87 y 88). Las aletas ventrales alcanzan el margen del pliegue de la aleta preanal, que se reduce casi totalmente en su parte anterior (Figura 89).

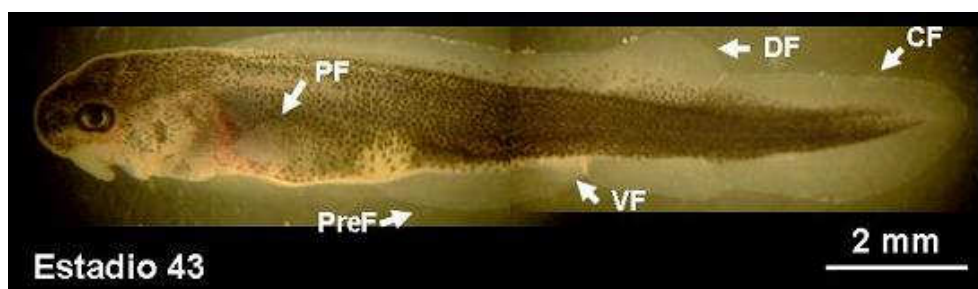
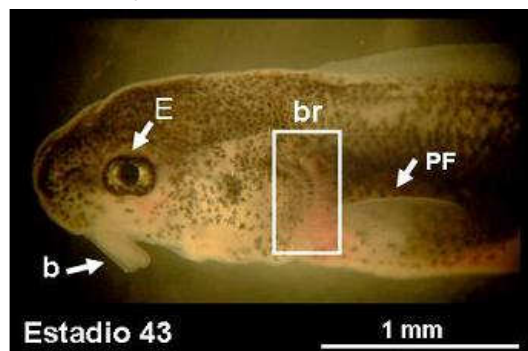


Figura 86. Vista general de un embrión en **Estadio 43**, donde pueden observarse las diferentes aletas, 10X.

Figura 87. Vista lateral de la zona anterior de un embrión de vida libre en **Estadio 43**. Se pueden ver las barbillas más alargadas (**b**), el ojo más definido (**E**), las hendiduras branquiales mostrando las branquias (**br**) y la aleta pectoral (**PF**), ahora más perpendicular respecto al cuerpo.



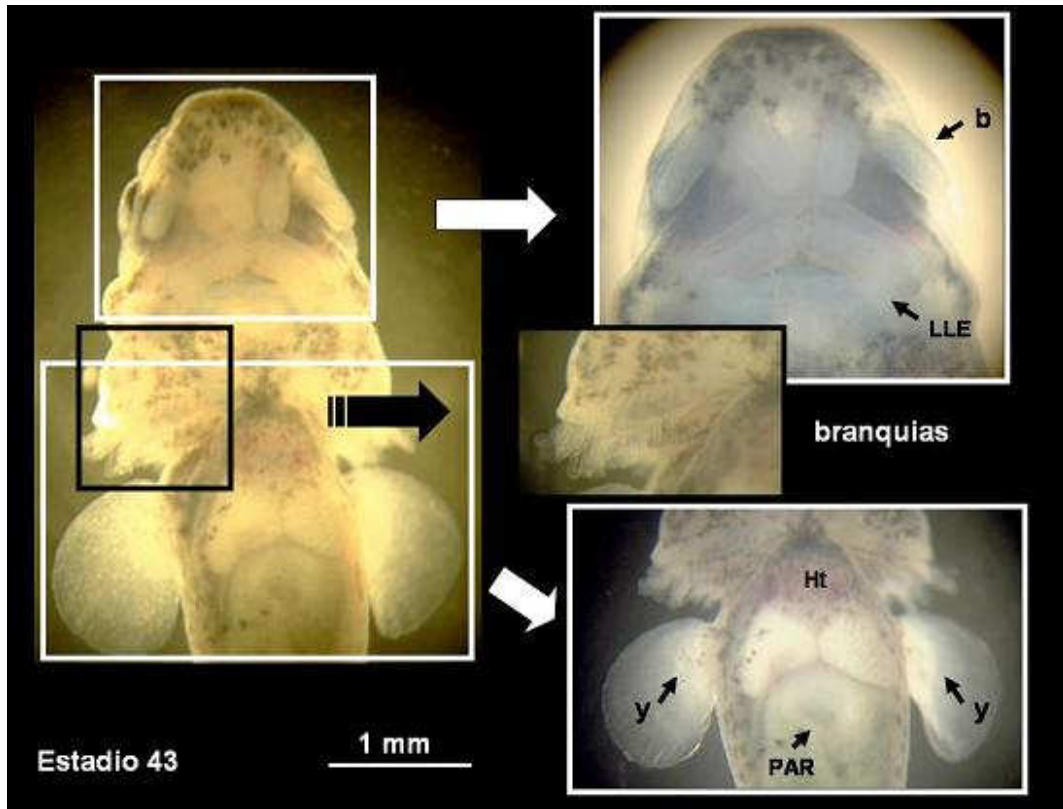


Figura 88. Vista ventral de la región anterior de un embrión de vida libre en Estadio 43. A la derecha se observan las distintas zonas ampliadas. Comenzando desde la cabeza, se distinguen las barbillas (**b**) más largas y la boca. A continuación un detalle de uno de los opérculos y las diferentes branquias asomando por debajo de éste y finalmente, la zona de las aletas pectorales (**PF**) sobre las que se distinguen los primordios musculares (**y**) y por transparencia se observa el corazón (**Ht**) y el rudimento de los apéndices pilóricos (**PAR**).

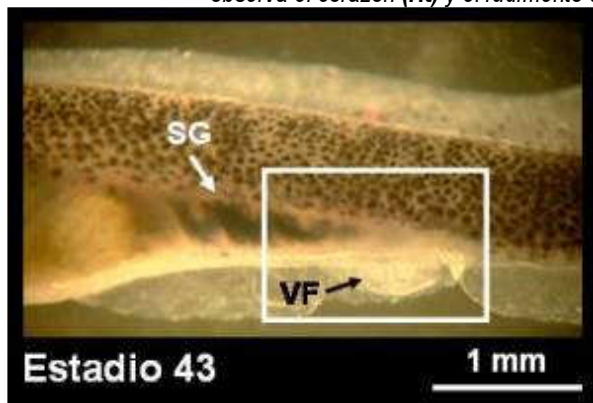


Figura 89. Detalle de la válvula espiral (SG) y la aleta ventral (VF) que alcanza el pliegue de la aleta preanal, 16X.

Estadio 44

Este estadio ocupa unas 30 horas aproximadamente. Transcurre entre el 6 dpe, aproximadamente durante las últimas 18 horas de este día, y las 12 primeras de los 7 dpe. Los embriones miden entre 17 y 18 mm de largo, su pigmentación es mucho más intensa. Se produce un incremento apreciable de melanocitos que cubren casi todo el flanco.

A lo largo de la membrana aletil, hasta la aleta dorsal, aparece una zona más densa que cubre algo más de la mitad de la misma y que puede verse a través de la epidermis; esta zona densa es el rudimento de los escudetes dorsales (SDR). Los rudimentos de los escudetes dorsales aparecen sobre la membrana aletil, pero aún no se distinguen de forma independiente. La altura de la aleta dorsal (DF) aumenta notablemente.

Los bordes de las aletas ventrales (VF) se extienden más allá del pliegue de aleta preanal y la sobrepasan. Los lóbulos de las aletas ventrales descienden debajo del margen del pliegue de aleta preanal. El extremo final del cuerpo adelgaza formando un ligero acodamiento (Figura 90).

Las aletas pectorales también crecen y además aparecen más redondeadas. Los primordios musculares se observan claramente en éstas. Los extremos de las barbillas centrales crecen pero no alcanzan el límite anterior de la boca mientras que las laterales lo alcanzan (Figura 91).

El anexo pilórico se sigue subdividiendo en lóbulos (PAR), pudiéndose distinguir desde el exterior dos o tres lóbulos. (Figura 88).

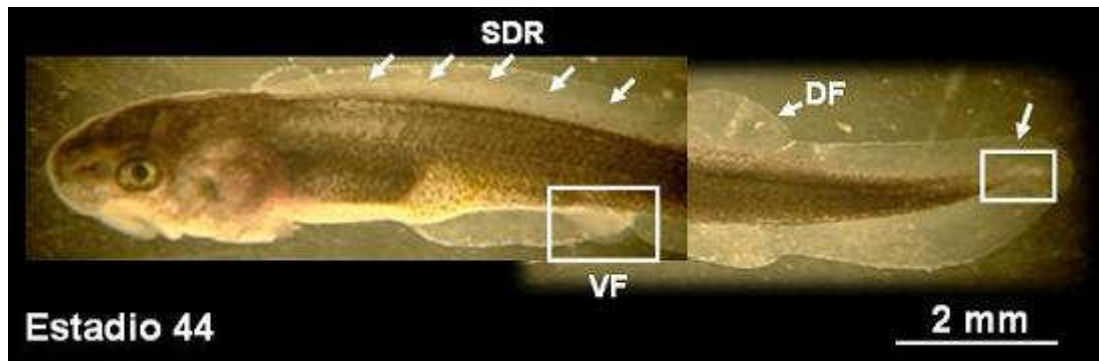


Figura 90. Vista general de un embrión de vida libre en **Estadio 44**, donde puede observarse en la membrana aletil una zona más densa, indicada con flechas (**SDR**) que son los rudimentos de los escudetes dorsales. A continuación se observa la aleta dorsal (**DF**) que ha aumentado de tamaño respecto al estadio anterior. El extremo de la cola doblado hacia abajo aparece encuadrado en blanco y señalado con una flecha. El lector también podrá apreciar como la aleta ventral (**VF**) ha sobrepasado el límite de la aleta preanal, 8X.

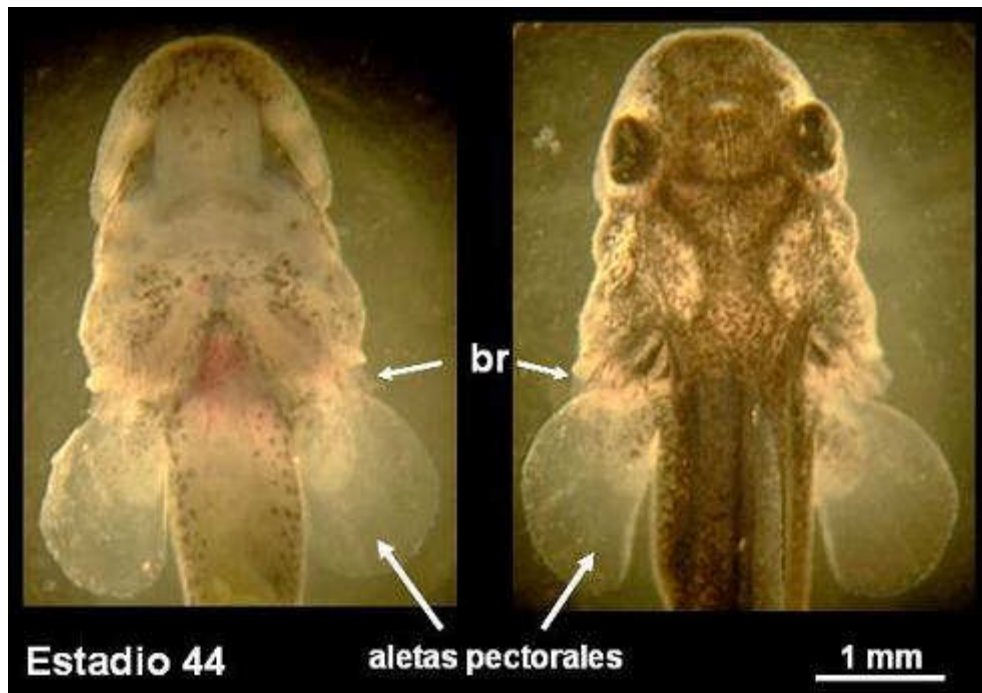


Figura 91. Parte anterior ventral y dorsal respectivamente en un embrión de vida libre en **Estadio 44**, 12.5X.

Estadio 45

Esta etapa ocupa la segunda mitad de los 7 dpe, unas 12 horas aproximadamente, es la etapa de transición a la alimentación activa. Los embriones miden de 18 a 19 mm de largo. Los embriones están sumamente pigmentados.

A lo largo de la parte dorsal de la membrana aletil aparecen zonas más densas individualizadas que corresponden al esbozo inicial de la serie de escudetes dorsales (SD). Cada una de estas zonas más densas se transformará posteriormente en un escudete.

Las aletas pectorales han crecido y se desplazan hacia el lado ventral, pasando de una posición más o menos perpendicular al cuerpo a otra más paralela a éste. El pliegue de aleta preanal es más estrecho que la aleta anal. Las aletas dorsal y anal aún no están separadas completamente de la aleta caudal aunque aparecen más definidas. El lóbulo ventral de la aleta caudal, que había comenzado a ensancharse en el estadio 39, es ahora mucho más amplio, lo que hace que la aleta caudal vaya tomando forma heterocerca (Figuras 92 y 93).

En cuanto a los cambios producidos en la parte de la cabeza, el iris está completamente pigmentado y las barbillas se alargan hasta casi alcanzar el borde anterior de la boca (Figura 94v).

Los rudimentos de los filamentos branquiales se forman sobre el cuarto arco branquial y se inicia la formación del espiráculo aunque en algunos embriones ya se ha abierto (Figura 94d).

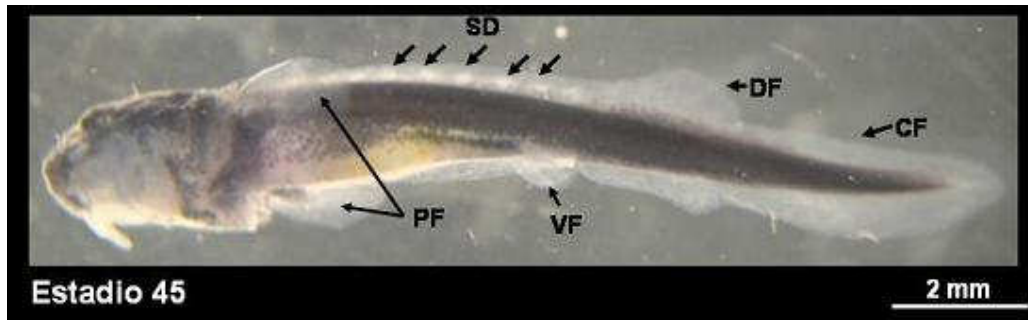


Figura 92. Embrión de vida libre en **Estado 45**, donde se observa que la zona más densa en la membrana aletil da lugar a manchas independientes correspondientes a los escudetes dorsales (**SD**). También se ven las diferentes aletas: aleta dorsal (**DF**), aleta caudal (**CF**), aleta ventral (**VF**) y aletas pectorales (**PF**), 8X.

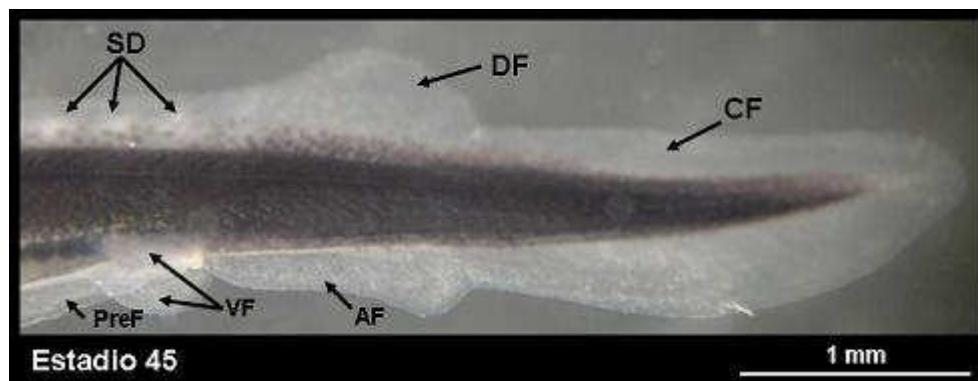


Figura 93. Detalle zona caudal de un embrión en **Estado 45**, donde pueden verse las distintas aletas: (**DF**) aleta dorsal, (**CF**) aleta caudal, (**AF**) aleta anal, (**VF**) aleta ventral, (**PreF**) aleta preanal y los escudetes dorsales (**SD**), 16X.

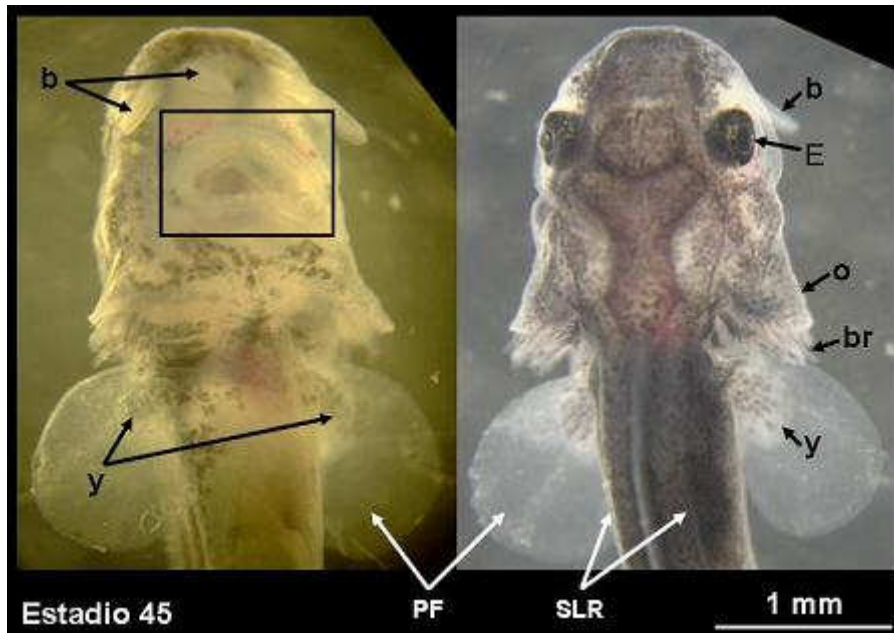
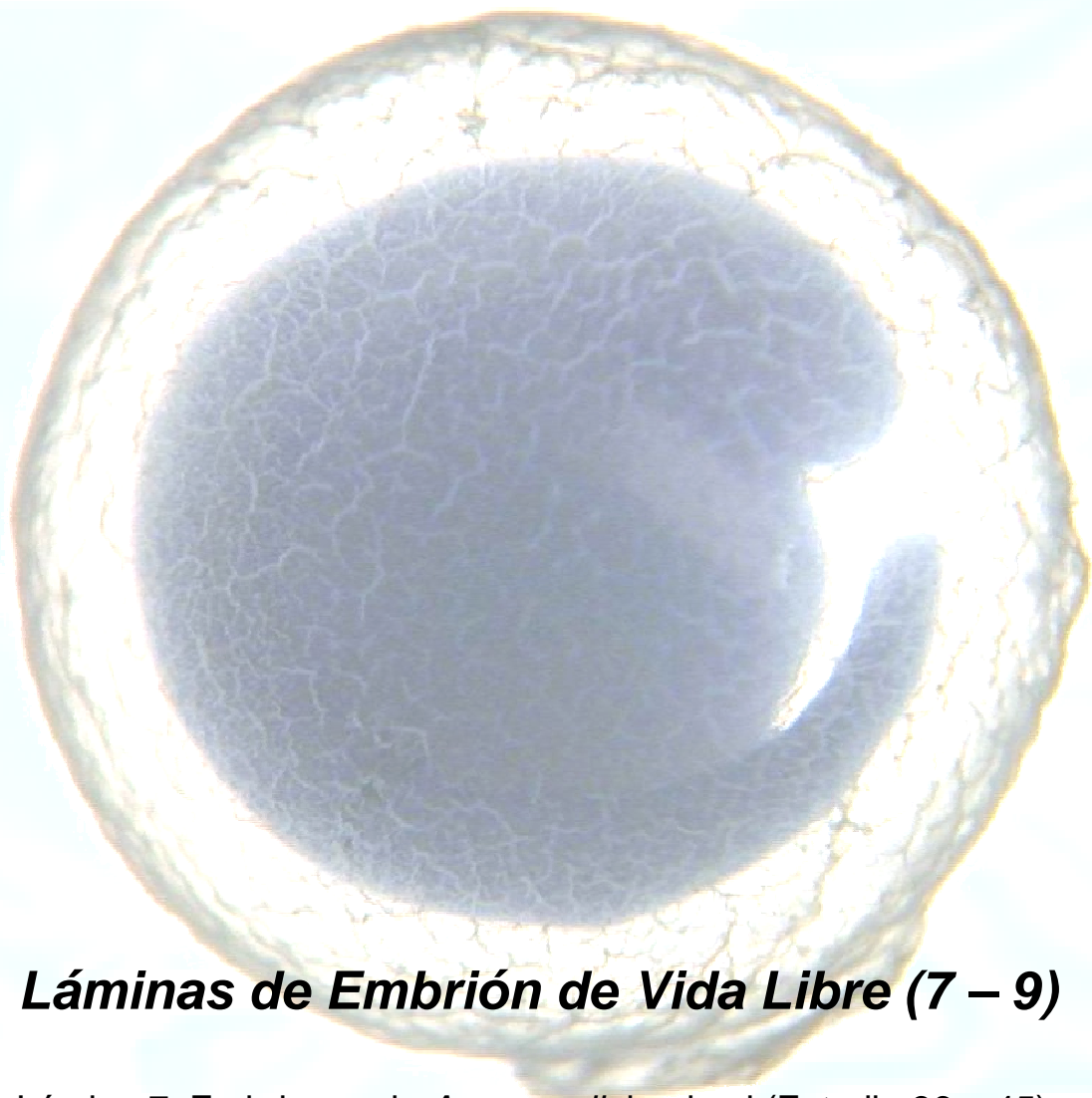


Figura 94v y 94d. Vista anterior ventral y dorsal respectivamente de un embrión de vida libre en **Estado 45**, en la foto de su izquierda se pueden observar las barbillas bastante largas (**b**), las yemas de los músculos (**y**) en las aletas pectorales (**PF**) y en el recuadro negro la boca donde podemos ver parte de la cavidad bucofaringea, los labios y los dientes. En la foto de la derecha se destacan el ojo (**E**), opérculo (**o**) y branquias (**br**) asomando por debajo del opérculo y a ambos lados de la membrana aletil, en la parte dorsal, aparecen dos flancos de color claro correspondiente a los rudimentos o esbozos de los escudetes laterales (**SLR**), 20X.

Tabla 7. Cronología del desarrollo del embrión de vida libre (Estadios 37 – 45)

Estadios de desarrollo	Tiempo desde la eclosión		Características específicas del estadio
	17 ° C	15 ° C	
36	ECLOSIÓN	ECLOSIÓN	<p>Eclosión en masa (Tm)</p> <p>Aún se distingue la glándula de eclosión (HG)</p> <p>Cabeza pequeña y doblada hacia el saco vitelínico</p> <p>Saco vitelínico con forma ovoide más ancho en su parte anterior</p> <p>Tracto intestinal parcialmente diferenciado y no comunicado con el exterior, (Llorente, 2006)</p> <p>Cola proterocerca</p> <p>Pigmentación débil</p>
37	1 dpe	1 – 2 dpe	<p>Se abre el primer par de hendiduras branquiales</p> <p>La cabeza se va enderezando</p> <p>Se localizan los rudimentos de las barbillas</p> <p>Comienza la apertura de la boca</p> <p>El saco vitelínico cambia su forma, ahora es más alargado</p> <p>El saco vitelínico comienza a subdividirse en el esbozo gástrico y esbozo intestinal (Llorente, 2006)</p> <p>El corazón adopta la forma de un tubo recto (Guerrero, 2007)</p> <p>Se distinguen los rudimentos de las aletas pectorales como pequeños pliegues de la epidermis</p> <p>Comienzo la separación de la cola y parte final del tronco</p>
38	1 – 2 dpe	2 - 3 dpe	<p>Apertura de la boca completa</p> <p>Aparecen los rudimentos branquiales y el primer arco branquial</p> <p>Aparecen los primeros melanocitos</p> <p>Comienza la pigmentación del iris</p> <p>Los orificios olfativos se alargan</p> <p>El pliegue endodérmico que separa estómago e intestino está incompleto.</p> <p>Comienza la diferenciación del intestino (Llorente, 2006)</p> <p>El corazón se desvía hacia la derecha adoptando forma de "C" (Guerrero, 2007)</p> <p>La aleta pectoral se observa por encima del saco vitelínico</p> <p>Se forman las primeras primordios musculares cerca de las aletas dorsal y anal</p> <p>Los rudimentos de filamentos branquiales aparecen bajo el opérculo</p>
39	2 dpe	3 dpe	<p>Se abre la segunda hendidura branquial y se alargan los filamentos branquiales</p> <p>Comienzan a aparecer los esbozos de los botones gustativos en las barbillas (Llorente 2006)</p> <p>Pigmentación más generalizada y fuerte</p> <p>La pared del saco vitelínico aparece dividida en varias partes</p> <p>El corazón ha adoptado la forma de una "C" (Guerrero, 2007)</p> <p>Aumenta el tamaño de las aletas pectorales y se desplazan</p> <p>La membrana aletil comienza a ensancharse para dar lugar al rudimento de la aleta dorsal. Las zonas de la aleta dorsal y anal se pigmentan</p> <p>El estómago se separa del intestino (Llorente, 2006)</p>
40	2 – 3 dpe	3 - 4 dpe	<p>Aumenta la concentración de melanocitos en general y en la zona de la cabeza en particular</p> <p>Los rudimentos de las barbillas se alargan</p> <p>El iris muestra un color marrón claro</p> <p>Los filamentos branquiales se alargan asomando por debajo del opérculo</p> <p>La cabeza comienza a separarse del cuerpo</p> <p>La base de las aletas pectoras casi alcanza la parte media de la superficie lateral del estómago</p> <p>La aleta dorsal aumenta de tamaño</p> <p>Aparecen los rudimentos de las aletas ventrales</p>

Estadios de desarrollo	Tiempo desde la eclosión		Características específicas del estadio
	17 ° C	15 ° C	
41	3 dpe	4 dpe	<p>La pigmentación está muy marcada</p> <p>El iris es más oscuro</p> <p>Las barbillas se enderezan</p> <p>Las branquias comienzan a formarse sobre el tercer arco branquial</p> <p>La morfología cardíaca externa experimenta cambios notables (Guerrero, 2007)</p> <p>Las aletas pectorales adquieren una posición oblicua</p> <p>La aleta preanal se va reduciendo</p> <p>El extremo de la aleta ventral se ensancha</p> <p>Los segmentos de los músculo ventrales crecen en la superficie lateral del cuerpo</p> <p>La cola se dobla suavemente hacia arriba</p> <p>El final de la línea lateral sobrepasa el final de las aletas pectorales y se acerca a la válvula espiral</p>
42	3 – 4 dpe	5 – 6 dpe	<p>Aparecen nuevos melanocitos (zona anterior de la región ventral y opérculo)</p> <p>Comienzan a aparecer botones gustativos en los labios (Llorente, 2006)</p> <p>El morro de los embriones es corto todavía</p> <p>Los rudimentos branquiales del tercer arco branquial aparecen por debajo del opérculo</p> <p>Las diferentes cámaras cardíacas van ocupando sus posiciones definitivas (Guerrero, 2007)</p> <p>Las aletas pectorales descienden hacia la zona media y se desplazan hacia delante</p> <p>Se distinguen las yemas de los músculos en las aletas pectorales</p> <p>Las aletas ventrales presentan una forma menos redondeada</p> <p>El compartimento gástrico adquiere forma de “U” y se diferencian las porciones pilóricas (tramo ascendente) y porción glandular del estómago (tramo descendente) (Llorente, 2006).</p>
43	4 dpe	6 dpe	<p>El morro adquiere la posición horizontal</p> <p>Las barbillas también adquieren una posición más horizontal</p> <p>La cuarta hendidura branquial se abre camino</p> <p>Se ensanchan los lóbulos de las aletas pectorales, su forma es más redondeada, se van separando del cuerpo</p> <p>Las aletas ventrales tocan el margen de la aleta preanal</p> <p>La aleta preanal se ha reducido mucho en su parte posterior</p>
44	4 – 5 dpe	6 – 7 dpe	<p>La pigmentación es más intensa y generalizada</p> <p>Los extremos de las barbillas crecen aunque las centrales aún no alcanzan el borde anterior de la boca</p> <p>Los botones gustativos son muy abundantes en el epitelio bucal y se distribuyen por toda la cavidad orofaríngea y primera porción de la cámara branquial (Llorente, 2006)</p> <p>Las aletas pectorales crecen y están más redondeadas</p> <p>En el pliegue de la aleta dorsal aparece el rudimento de los escudetes dorsales</p> <p>Los lóbulos de las aletas ventrales sobrepasan el margen del pliegue preanal</p> <p>El extremo final del cuerpo adelgaza y comienza a doblarse hacia abajo</p>
45	5 dpe	7 dpe	<p>Etapa de transición a la alimentación activa (exógena)</p> <p>Inicio alimentación exógena (Llorente, 2006)</p> <p>El iris está totalmente pigmentado</p> <p>Los rudimentos branquiales se han formado sobre el cuarto arco branquial</p> <p>Comienza la formación del espiráculo hemibranquial</p> <p>Se separan los rudimentos de los escudetes dorsales que se ven sobre el pliegue de la aleta dorsal de forma independiente</p> <p>Las aletas pectorales crecen y se desplazan hacia el lado ventral</p> <p>Las aletas dorsal y anal aún no están separadas completamente de la aleta caudal</p> <p>Se amplía el lóbulo ventral de la aleta caudal</p> <p>Los embriones adquieren la estructura cecal típica de juvenil y adulto (Llorente, 2006)</p>



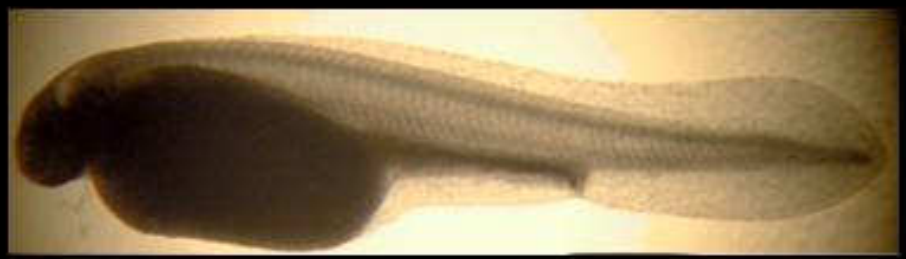
Láminas de Embrión de Vida Libre (7 – 9)

Lámina 7. Embriones de *A. naccarii* desde el (Estadio 36 – 45)

Lámina 8. Regiones cefálicas de los embriones de *A. naccarii* en los Estadios (36 - 45)

Lámina 9. Evolución de la región caudal en embriones de *A. naccarii* (Estadios 37 – 45)

2 mm



Estadio 36



Estadio 41



Estadio 37



Estadio 42



Estadio 38



Estadio 43



Estadio 39



Estadio 44



Estadio 40



Estadio 45

Lámina 7

Embriones de vida libre de *Acipenser naccarii*, desde el Estadio 36 (momento de la eclosión) hasta el Estadio 45 (transición a la alimentación exógena).

Lámina 7

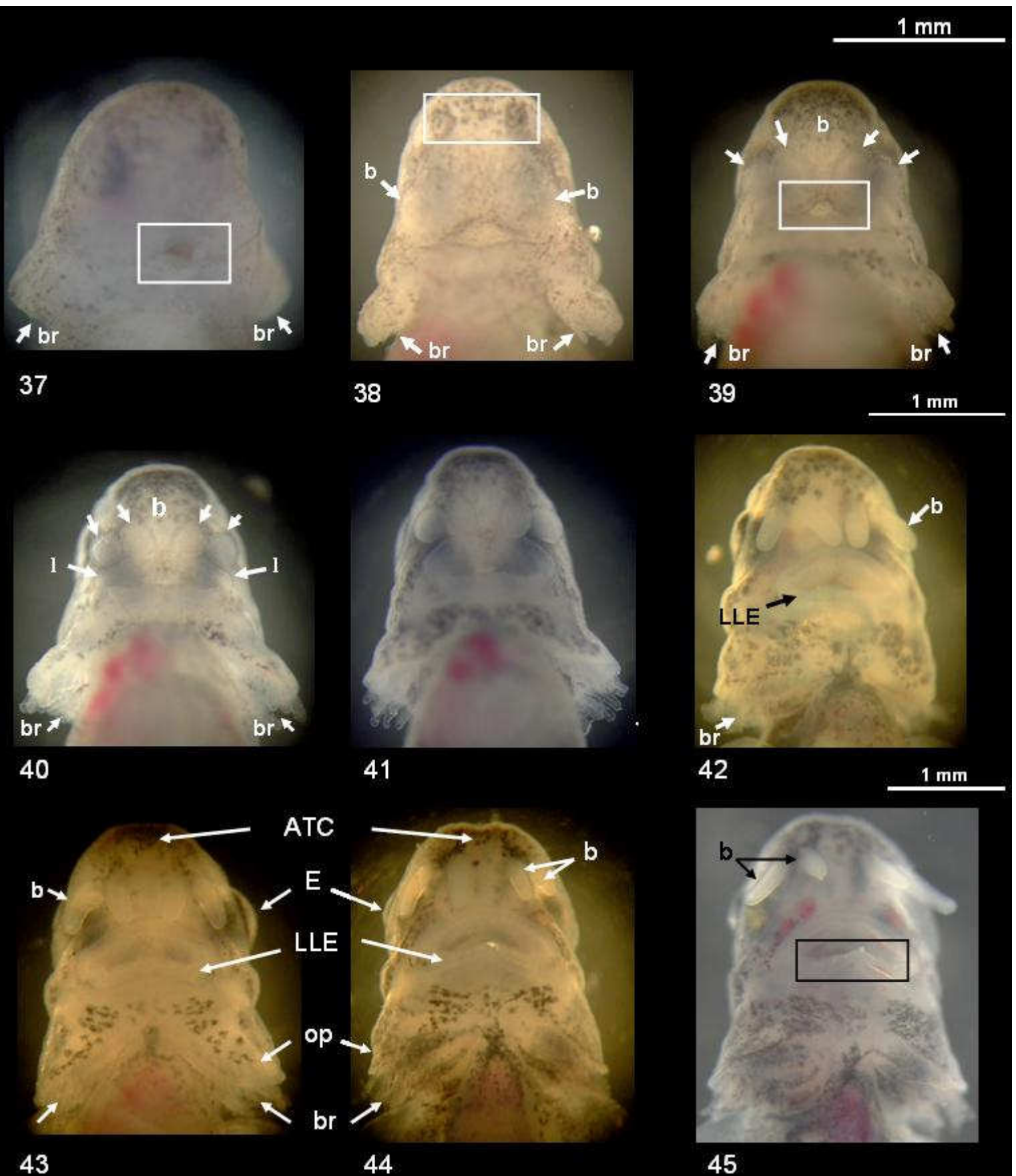
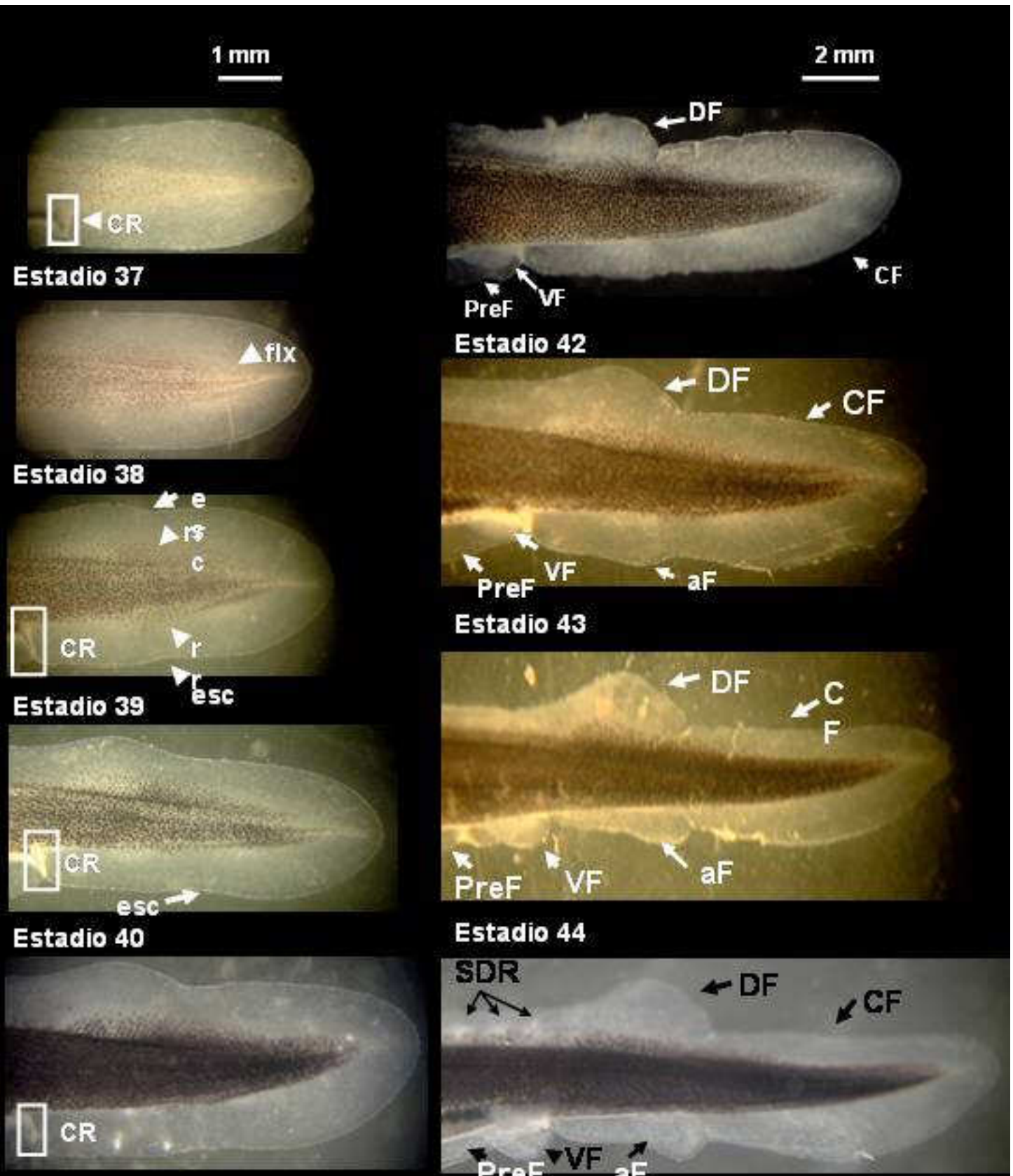


Lámina 8. Región cefálica de los embriones de vida libre de *A. naccarii* en los Estadios (37 a 45). Vista desde el lado ventral.

donde:

ATC: comisura anterior transversal; **br:** branquias; **b:** barbillas; **E:** ojo; **l:** labio; **LLE:** borde del labio inferior donde éste es interrumpido; **op:** opérculo

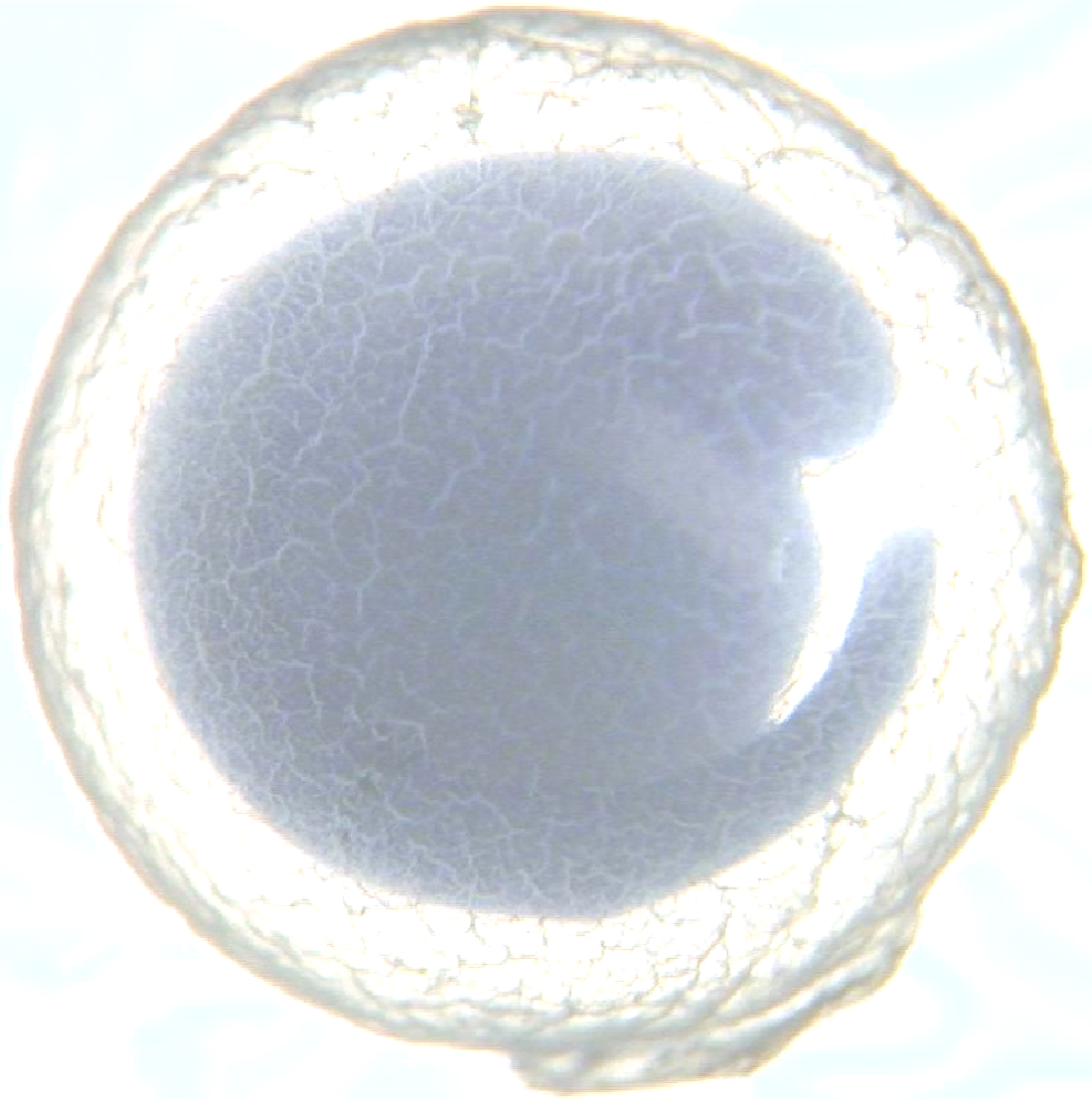


Estadio 41

donde,
aF = aleta anal; **CR** = rudimento de la cloaca;
CF = aleta caudal; **DF** = aleta dorsal
esc = escotadura
flx = flexión del extremo caudal
PreF = aleta preanal; **rr** = rudimento de los radios
SDR = rudimento escudetes
 Dorsales; **VF** = aletas ventrales

Estadio 45 Lámina 9

Evolución de la región caudal en embriones de vida libre de *Acipenser naccarii*, desde el Estadio 37 al 45, donde puede apreciarse la formación de las diferentes aletas a lo largo del tiempo en que transcurren los diferentes estadios.



3.3. Etapa Juvenil

3.3 Etapa Juvenil

La fase de juvenil en *Acipenser naccarii*, al igual que la de otros esturiones y peces en general, se extiende hasta el momento de la primera maduración sexual, momento en el que se inicia la fase adulta. Se ha visto que comienza en el Estadio 46, lo que equivale al día 8 post – eclosión (8dpe).

En esta etapa, como ya se ha comentado en Material y Métodos, los muestreos se han espaciado en el tiempo y durante una semana se han realizado cada 12 horas, ya que los cambios que tienen lugar en los juveniles se van ralentizando, y la siguiente semana cada 24 horas. Después cada 5 días y finalmente cada 15 días. (Ver Tabla 9) al final del capítulo).

A partir de aquí y en general, los embriones presentan una coloración bastante uniforme a lo largo y ancho de todo el cuerpo.

Estadio 46 (8 dpe)

Los escudetes dorsales (SD) aparecen como estructuras independientes de forma triangular de material denso, que aparece resaltado en la membrana aletil. (Figura 95). El número de escudetes, no es constante, se presentan en número variable entre 8 – 14.

Aunque exteriormente no aparecen, en muchos ejemplares, a cada lado del cuerpo se aprecia una fila de estructuras de material denso de color blanquecino que transcurren paralelas a la membrana aletil, donde se encuentran los SD, y que son las series de escudetes laterales (SL).

Las aletas pectorales han crecido y se van separando del cuerpo, presentando una forma claramente redondeada. En su base, los primordios musculares aparecen marcados. (Figuras 98). Las aletas ventrales superan claramente la aleta preanal, que muestra un lóbulo más ancho en su extremo final. El resto de aletas, dorsal, anal y caudal no presentan variación respecto al Estadio 45. (Figura 95).

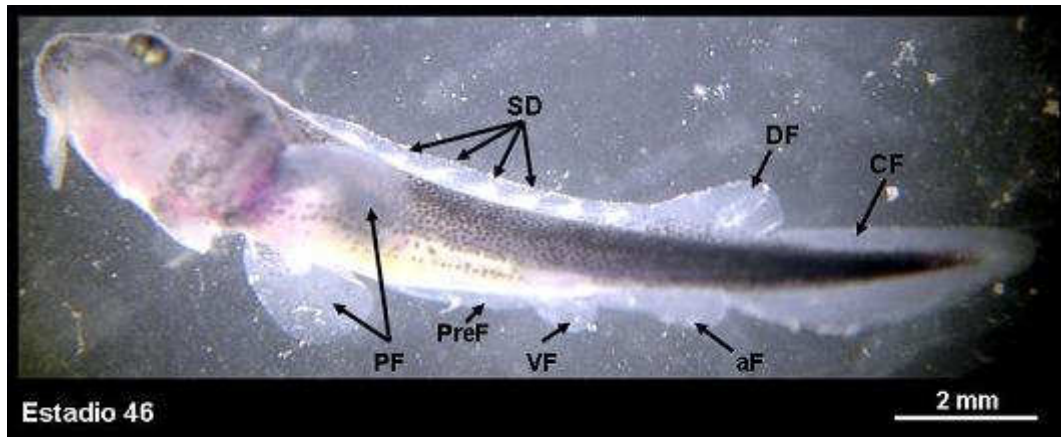
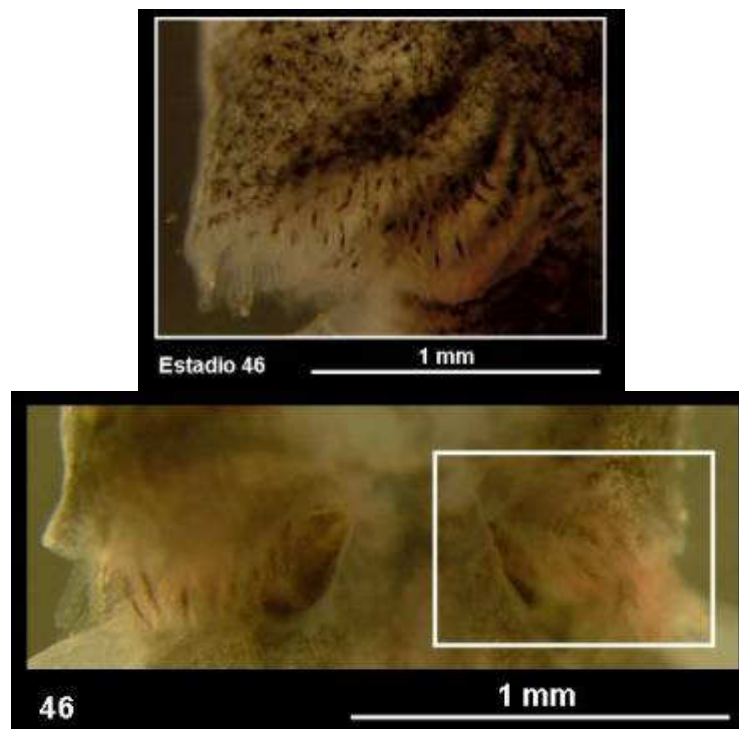


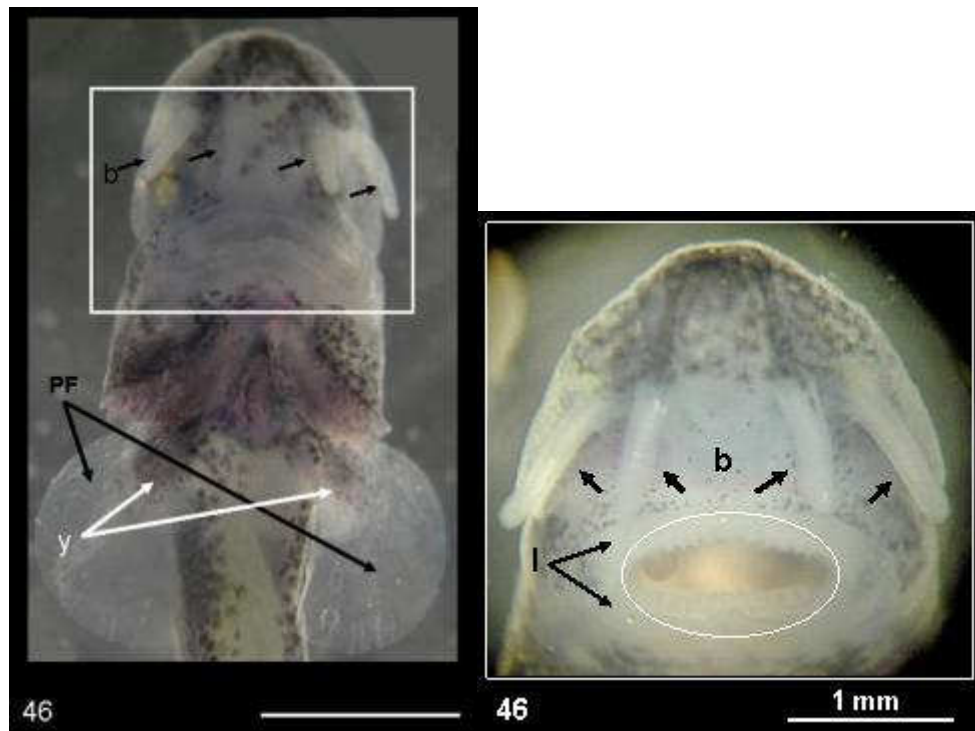
Figura 95. Juvenil en **Estadio 46**, aparecen de forma independiente, los escudetes dorsales (**SD**) en la membrana aletil (**FF**). También se aprecian claramente todas las aletas: aleta dorsal (**DF**), aleta caudal (**CF**), aleta anal (**aF**), aleta preanal (**PreF**), aletas ventrales (**VF**) y aletas pectorales (**PF**).



Figuras 96 y 97. Detalle hendiduras branquiales (vista ventral) y branquias (vista dorsal) que sobresalen por debajo del opérculo en un juvenil en **Estadio 46**.

Las hendiduras branquiales se observan claramente y las branquias sobresalen por debajo de los opérculos con gran concentración de células sanguíneas. (Figuras 96 y 97).

En cuanto a la zona de la cabeza, en vista ventral podemos apreciar la forma del morro que se va redondeando cada vez más. Se diferencian los dientes, labios y las barbillas que se han alargado, las barbillas centrales tocan los labios superiores y las exteriores lo sobrepasan. (Figuras 98 y 99).



Figuras 98 y 99. Vista ventral de la parte anterior de un juvenil en **Estadio 46 (figura 98)**, donde se ven las 4 barbillas (**b**), las aletas pectorales (**PF**) y los primordios musculares (**y**) sobre las mismas y vista ventral del morro de un juvenil en Estadio 46, (**figura 99**) donde se señalan las barbillas (**b**), los labios (**l**) y rodeado por una elipse la zona donde aparecen los dientes.

Estadio 47 (9 y 10 dpe)

Este estadio se caracteriza por cambios importantes en la membrana aletil y en la mayoría de las aletas. Al principio de dicho estadio, los escudetes dorsales (SD) casi alcanzan el borde de la membrana aletil sobre todo en la zona anterior pegada a la cabeza, donde comienza la membrana y es más estrecha. (Figura 100).

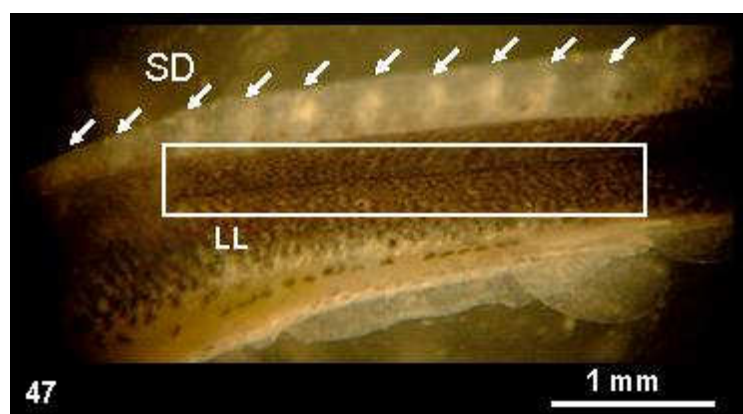


Figura 100. Juvenil al inicio del **Estadio 47**, donde se presentan los escudetes dorsales (**SD**) de forma independiente, que aún no tocan el borde de la membrana aletil. Encuadrada vemos la línea lateral (**LL**) lugar de formación de los escudetes laterales (**SL**).

Al final de este estadio, prácticamente todos los escudetes dorsales han alcanzado el borde de la membrana y presentan una forma triangular, con la base más ancha y los

extremos acabados en punta. Estos tienden a doblarse hacia atrás. A su vez, la membrana aletil va reduciéndose a lo largo y ancho de toda la zona dorsal y en su base se observa una débil pigmentación. (Figura 101).



Figura 101. Juvenil al final del **Estadio 47**, los escudetes dorsales (**SD**) ya tocan el borde de la membrana aletil. Los flancos brillantes que aparecen en la zona ventral corresponden al lugar de formación de los escudetes ventrales (**SV**).

Las franjas paralelas que pertenecen a los (SL), se encuentran ahora más marcadas. A ambos lados de la válvula espiral siguiendo la línea de las aletas ventrales se observan dos franjas plateadas y brillantes que corresponden al lugar de formación de la serie ventral de escudetes (SV). (Figura 101).

En las aletas pectorales la zona pigmentada aumenta su tamaño y se oscurece, proceso que se prolonga en los días sucesivos, a la vez que las aletas se alargan y comienzan a perder la forma redondeada. (Figura 102).

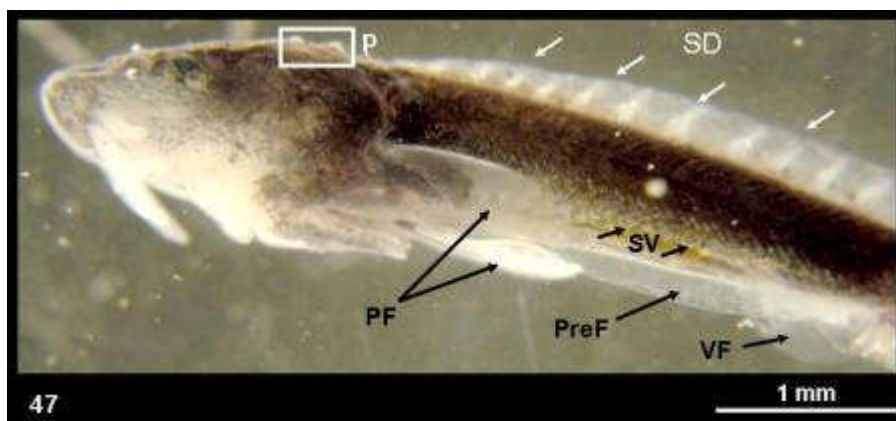
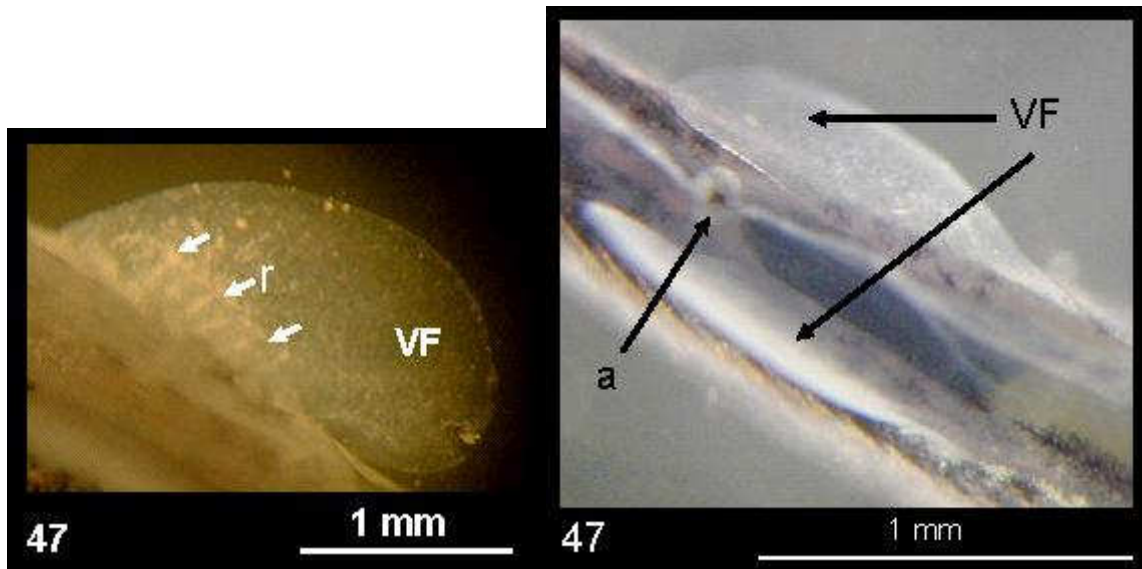


Figura 102. Vista lateral de un juvenil en **Estadio 47**, donde se presentan las aletas pectorales (**PF**), preanal (**PreF**) y ventral (**VF**), así como las líneas de escudetes ventrales (**SV**) y en la zona dorsal los escudetes dorsales (**SD**) y las pinnulas (**p**) en la cabeza encuadrada en blanco.

Las aletas ventrales o pelvianas también han experimentado cambios a lo largo del estadio. Al inicio presentaban forma redondeada y los radios ya se hacían visibles en su base. (Figura 103). Mientras que han incrementado su tamaño y sus extremos se presentan más alargados. Entre ambas aletas se encuentra el ano. (Figura 104).



Figuras 103 y 104. Aletas pelvianas (VF) de Juvenil en **Estadio 47**, en vista ventral, al inicio del Estadio, su forma es más redondeada y aquí podemos apreciar claramente en su base el inicio de formación de los radios (r), (figura 103), y al final del mismo son más alargadas y el ano (a) entre ambas, (figura 104).

Las aletas dorsal, anal y caudal aparecen casi totalmente separadas. La aleta dorsal está totalmente definida pero no separada de la caudal aunque se marca claramente el surco de separación entre ambas. La formación de los radios sobre la yema de los músculos queda patente en la base de la aleta dorsal y en la parte superior de la caudal antes que en la zona inferior, ya que esta zona aparece bastante pigmentada. El extremo de la aleta caudal aparece claramente curvado. (Figura 105).

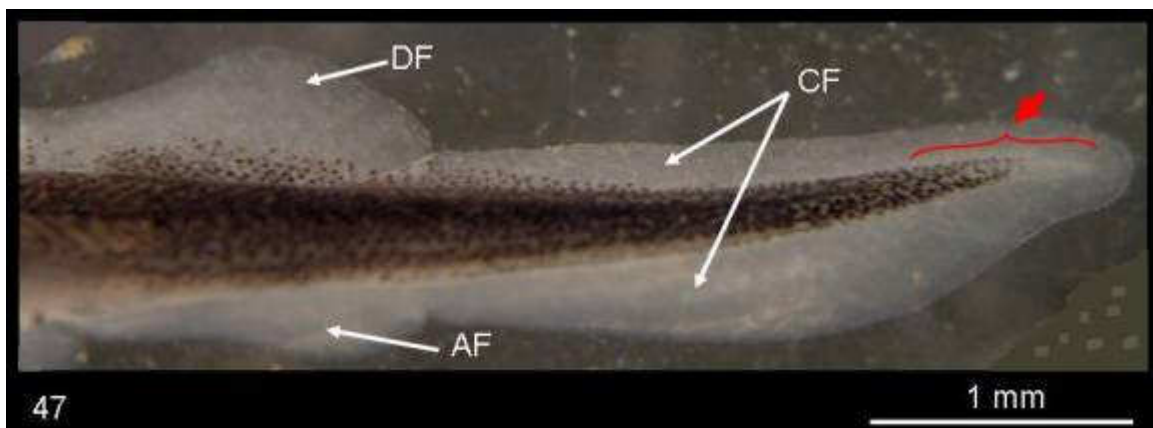


Figura 105. Parte posterior de un juvenil en **Estadio 47** donde están definidas las aletas impares dorsal (DF), anal (AF) y caudal (CF), en esta última se puede observar, en rojo, como su extremo aparece curvado.

En la parte dorsal de la cabeza, por detrás de los ojos aparecen unas pínulas, concretamente se han observado dos a cada lado de la cabeza, a la altura y por encima del opérculo que llegan hasta el borde donde comienza la membrana aletil (FF). (Figura 106).

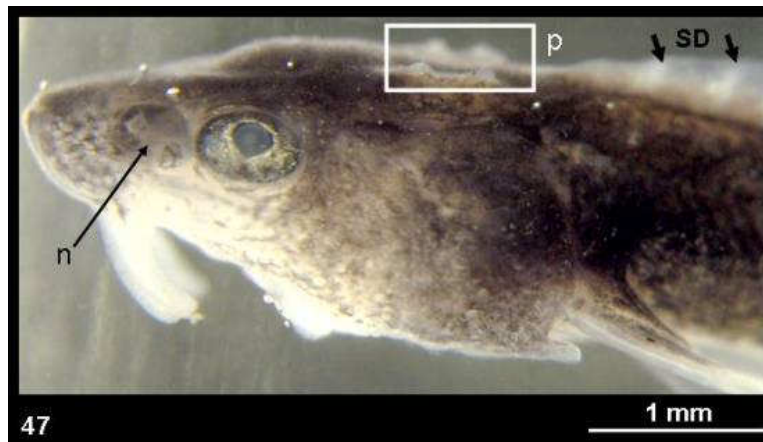


Figura 106. Parte anterior de un juvenil en **Estadio 47** donde se señalan las pínulas encuadradas en blanco (**p**), inmediatamente detrás se inserta la membrana aletil en la que se pueden apreciar los dos primeros escudetes dorsales (**SD**). El ejemplar presenta un morro redondeado y la narina (**n**), bastante grande, justo por delante del ojo.

Estadio 48 (11 - 13 dpe)

En este estadio destaca la rápida evolución que sufren los escudetes dorsales (SD). La base triangular de los mismos se ha ido ensanchando, han pasado de estar independientes a casi tocarse por su base, todos han alcanzado el borde superior de la membrana aletil (FF) y algunos acaban sobrepasándola, ya que está en proceso de reabsorción. Los extremos de los escudetes se van curvando hacia atrás cada vez más. La secuencia de curvatura va desde la zona dorsal hacia la caudal, al mismo tiempo que ocurre la reabsorción de la membrana. (Figura 107).

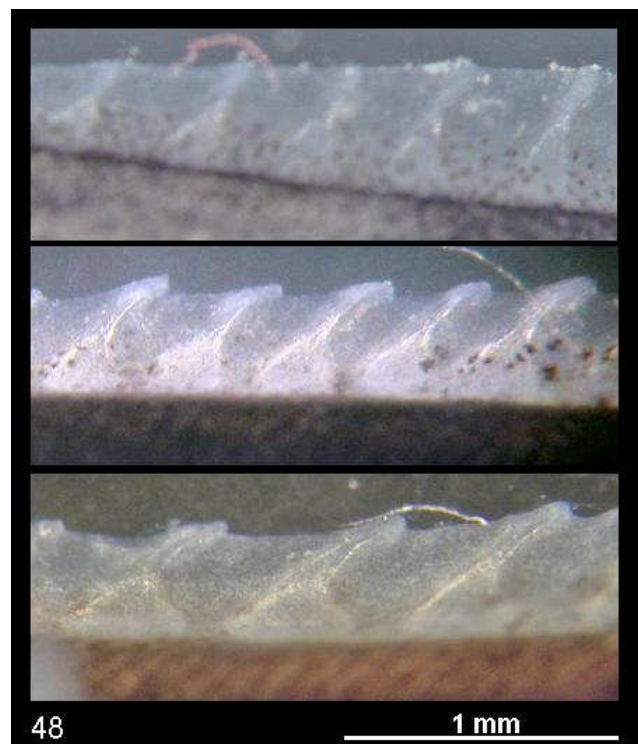


Figura 107. Evolución de los escudetes dorsales (**SD**) durante el **Estadio 48**

En vista dorsal los escudetes (SD) aparecen como una cresta, en medio del dorso, que se extiende a ambos lados. Paralelos a los escudetes dorsales (SD) transcurren dos cordones más finos con tonalidad blanquecina que corresponden a los escudetes laterales (SL), aunque externamente no son visibles todavía. (Figura 108).

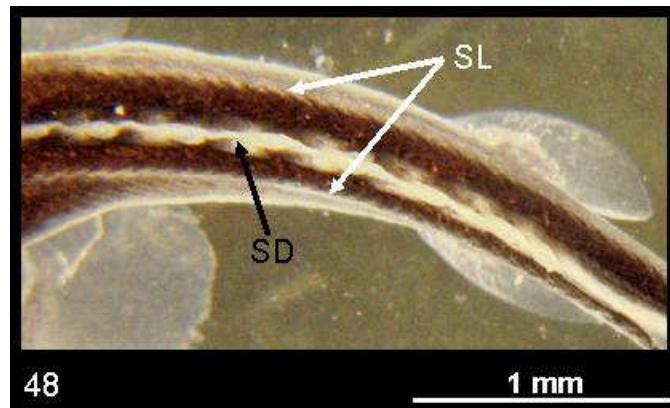


Figura 108. Vista dorsal de un juvenil en **Estadio 48** donde se distinguen los escudetes dorsales (**SD**) y las dos filas paralelas de escudetes laterales (**SL**).

A medida que avanza este estadio, la membrana continúa reabsorbiéndose, los escudetes sobrepasan el borde de la membrana y los extremos de los escudetes están cada vez más curvados. En la zona basal de los escudetes (SD) se observa presencia de piel y consecuente aumento de la pigmentación.

Hacia el final del estadio (13 dpe), ocurren varios procesos de forma combinada. Mientras la base de los escudetes crece hasta tocarse, el cuerpo superior continúa doblándose hacia atrás (Figura 109), la membrana aletil se ha reabsorbido casi en su totalidad en la parte dorsal anterior, cerca de la cabeza, y la pigmentación de la piel se extiende desde la base hasta aproximadamente alcanzar la mitad del cuerpo superior del escudete. Otro proceso conjunto al descrito es la aparición de un número variable de nuevos escudetes, de localización variable a lo largo de la serie, que reciben el nombre de secundarios, (SD 2°), siempre intercalados entre dos escudetes dorsales primarios que continúan su crecimiento (Figuras 110 y 111).

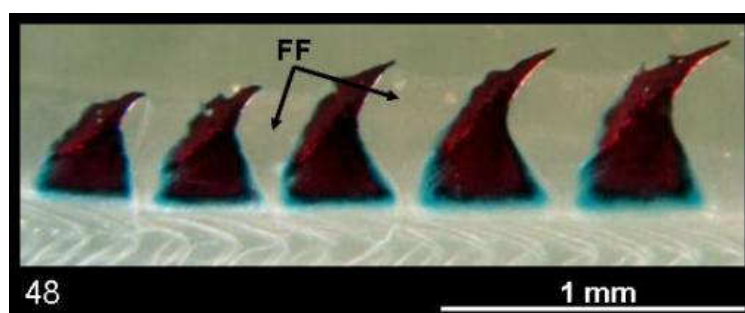


Figura 109. Vista lateral de escudetes dorsales (**SD**) de un juvenil en **Estadio 48** sometido a tinción (azul alcian – rojo alizarina), donde se destaca la membrana aletil (**FF**), que se va reabsorbiendo, y la curvatura de los escudetes.

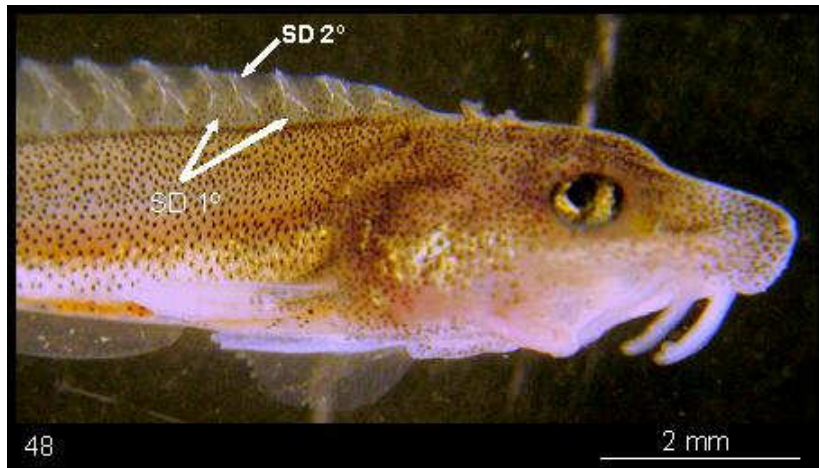


Figura 110. Vista dorsal de un juvenil en **Estadio 48** donde se distinguen los escudetes dorsales primarios (**SD1°**) y entre ellos un escudete dorsal secundario (**SD2°**).

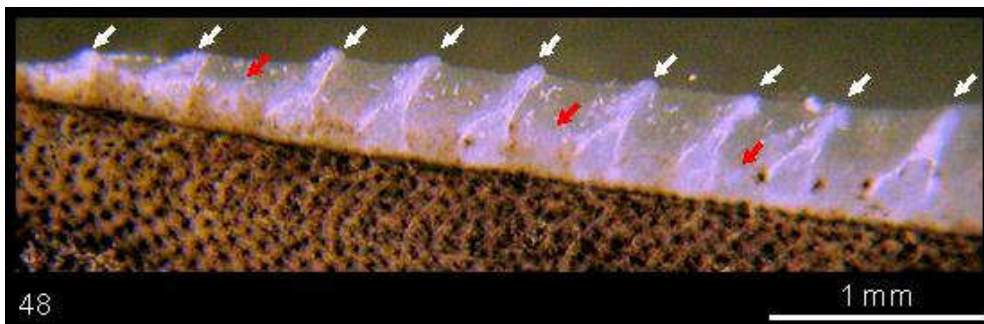


Figura 111. Vista lateral de un juvenil en **Estadio 48** donde se distinguen los escudetes dorsales primarios (**SD1°**), señalados con flechas de color blanco y los escudetes dorsales secundarios (**SD2°**), que se van formando, señalados con flechas de color rojo.

Las pínulas al tiempo que aumentan su tamaño, se curvan hacia atrás y pueden incrementar su número a ambos lados de la cabeza. Al igual que los escudetes, su número es variable de un ejemplar a otro, en algunos individuos los dos pares de pínulas que aparecían detrás de los ojos se subdividen en otras dos, dando un lugar de cuatro pínulas mientras que en otros individuos se observan tres pínulas en esa misma zona. (Figura 112).

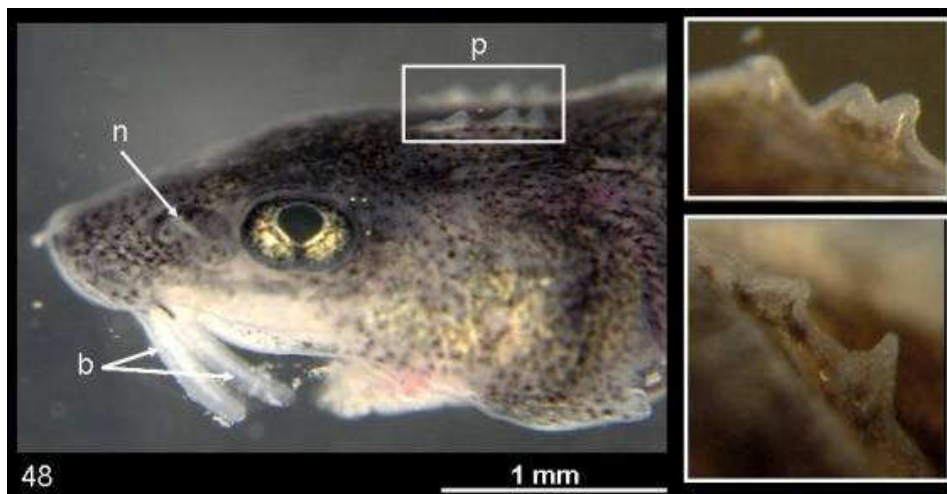


Figura 112. Parte anterior de un juvenil en **Estadio 48** donde se señalan la narina (**n**), las barbillas (**b**) más largas y las pínulas encuadradas en blanco (**p**). En la parte derecha se detallan dos patrones de pínulas en otro ejemplar del mismo estadio.

Se aprecian claramente los opérculos y las distintas filas de branquias que sobresalen por debajo aunque sin cambios destacables con respecto al estadio anterior. Los melanocitos tienen forma estrellada y se extienden también por toda la zona ventral de los opérculos y hacia los flancos. (Figura 113).

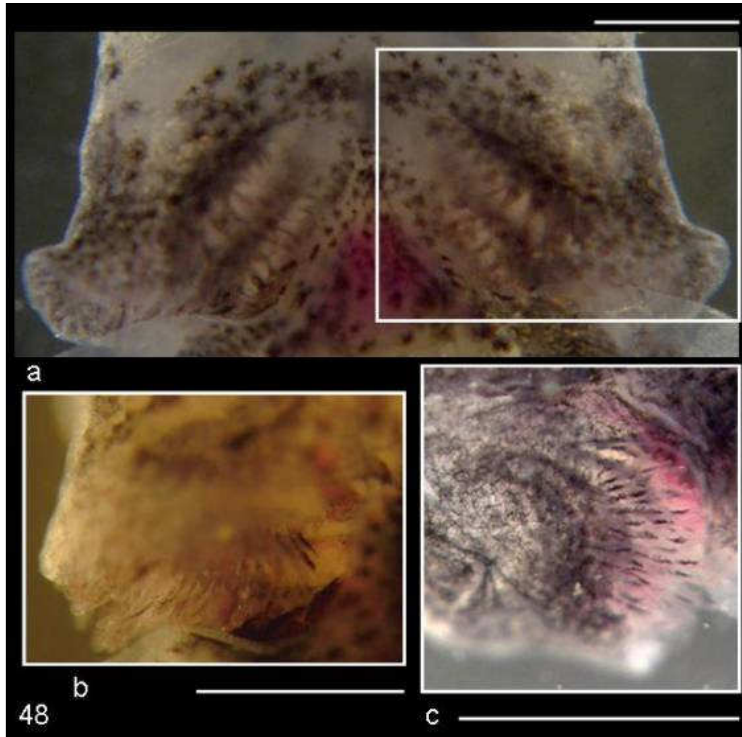


Figura 113. Zona opercular de un juvenil en **Estadio 48** donde se observa: **a)** Vista ventral de los opérculos y las branquias, así como el patrón de pigmentación; **b)** Vista dorsal del opérculo y branquias sobresaliendo por debajo; **c)** Vista lateral de las branquias y de color rojo el flujo sanguíneo. La escala señalada con una línea blanca corresponde a 1 mm.

Hacia el final de este estadio, los primeros dientes de los juveniles comienzan a caerse, no siguen una secuencia exacta sino que lo van haciendo al azar, de arriba y abajo indistintamente y tanto de un lado como de otro. (Figura 114).

Figura 114. Detalle de la boca de un juvenil en **Estadio 48**. **a)** Vista ventral de la boca de un juvenil fotografiado al natural; **b)** Vista ventral de la boca de otro juvenil en el mismo estadio sometido a tinción (azul alcian – rojo alizarina) en la que se aprecian claramente las 4 placas basales donde se insertan los dientes. Podemos ver rodeado en rojo los espacios vacíos antes ocupados por dientes que comienzan a caerse. Por debajo de las placas basales se aprecia la segunda fila de dientes mandibulares.



Las aletas pectorales se van cubriendo hasta la mitad con la piel, y los radios de las aletas aparecen en las yemas de los músculos. La forma de las aletas es ahora menos redondeada y se aprecia claramente su separación respecto al cuerpo. (Figura 115).

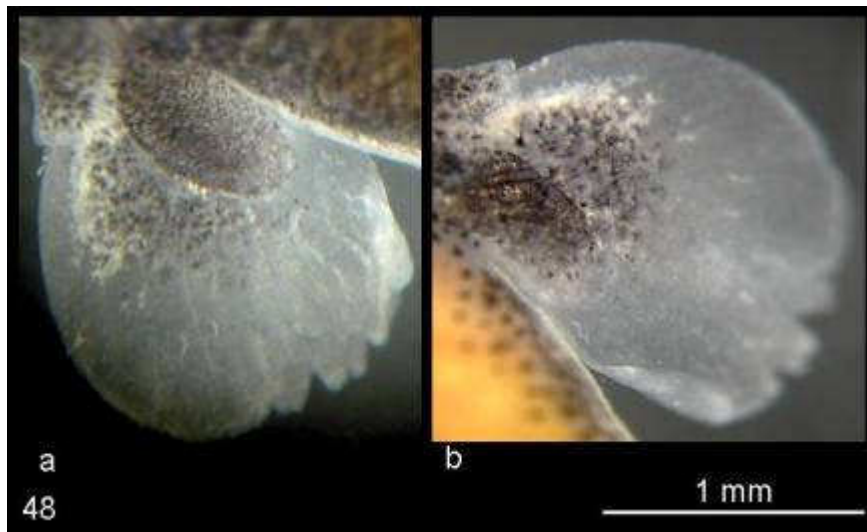
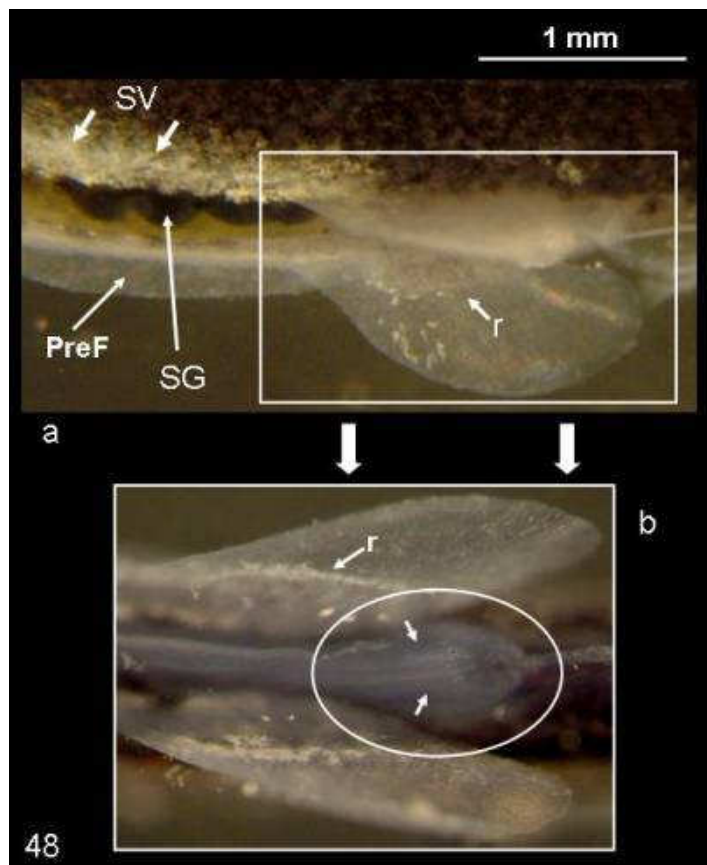


Figura 115. Vista de las aletas pectorales de un juvenil en **Estadio 48**: a) vista dorsal y b) vista ventral.

Aunque las aletas ventrales apenas sufren variación respecto al estadio anterior, el ano desarrolla a su alrededor una membrana fina y en la porción lateroventral del abdomen se desarrollan dos franjas de color plateado donde posteriormente se formarán los escudetes ventrales (SV). (Figura 116).

Figura 116. Vista ventral de un juvenil en **Estadio 48** donde se aprecia en: a) los flancos plateados correspondientes al lugar de formación de los escudetes ventrales (SV), la aleta preanal (PreF) y válvula espiral (SG). Encuadradas en blanco las aletas ventrales con las yemas donde se están formando los radios (r) y en b) detalle de las aletas, entre ellas y rodeado se encuentra el ano en el que se señala con dos flechas blancas la estructura membranosa descrita en el texto.



Las aletas dorsal, anal y caudal sufren pocos cambios respecto al estadio anterior. La zona caudal se estiliza doblándose más hacia arriba, se observan los radios rodeados por las aletas. (Figura 117).

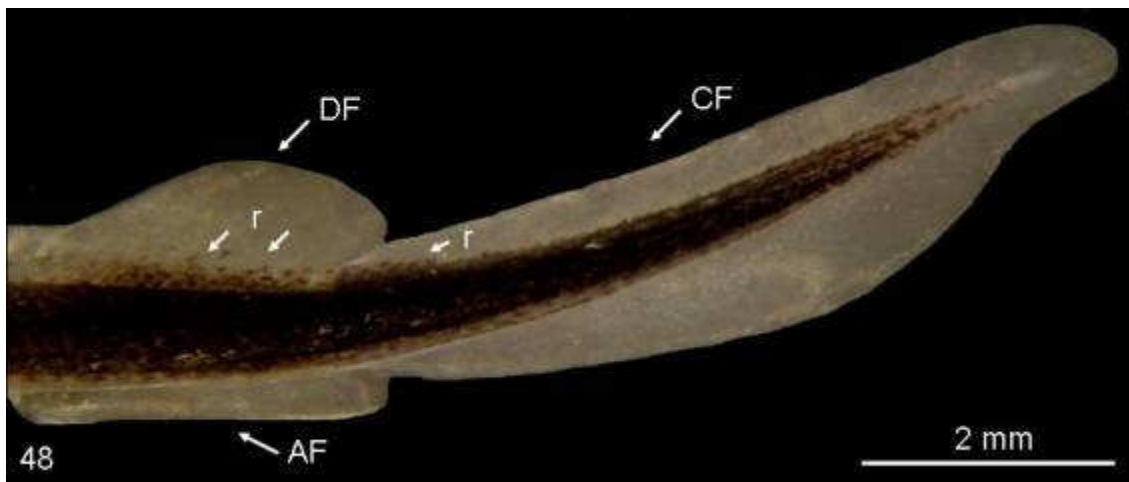


Figura 117. Parte final de un juvenil en **Estadio 48** donde se ven claramente las aletas dorsal (DF), anal (AF) y caudal (CF), así como los radios (r).

Estadio 49 (14dpe – 26 dpe)

Al final del estadio anterior todos los escudetes dorsales habían sobrepasado la membrana aletil. En este estadio destaca la rápida reabsorción de la membrana, sobre todo en la parte anterior cerca de la cabeza, dejando prácticamente libre los primeros escudetes. (Figura 118).

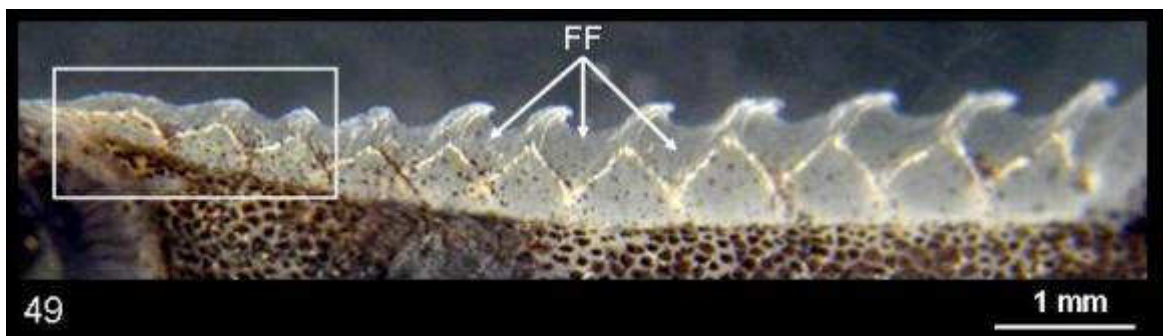


Figura 118. Escudetes dorsales (SD) de un juvenil en **Estadio 49**, donde se observan encuadrados en blanco los primeros escudetes prácticamente libres de membrana y señalado con (FF) la membrana aletil.

Los extremos superiores de los escudetes se encuentran muy doblados hacia atrás, sus bases se han ensanchado y aunque lateralmente parecen tocarse, en realidad no se produce contacto entre ellas. (Figura 120b y 121). La pigmentación se extiende por toda la zona de los escudetes dorsales (SD). (Figuras 119 y 120).



Figura 119. Detalle de los escudetes dorsales de un juvenil en **Estadio 49**, donde se aprecian claramente los extremos de los mismos que tienden a doblarse cada vez más.

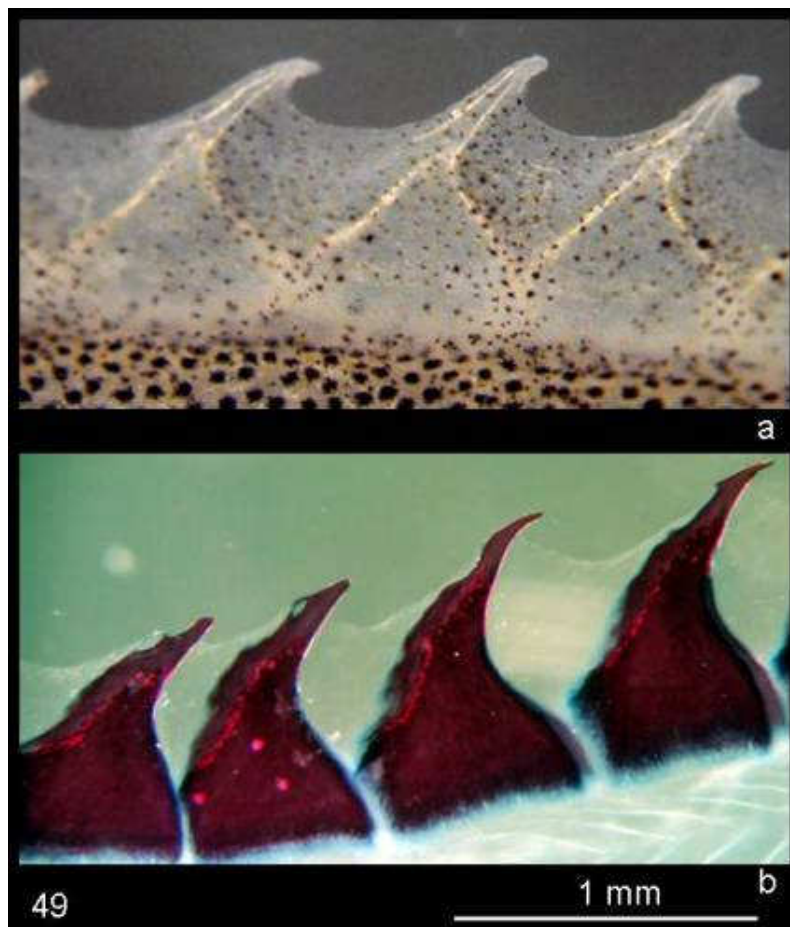


Figura 120. Detalle de los escudetes dorsales (**SD**) de un juvenil en **Estadio 49**. **a)** Escudetes sin teñir, vistos lateralmente, parecen unidos por su base. **b)** Distinguimos los escudetes sometidos a tinción azul alcian – rojo alizarina, sus bases están muy cerca pero realmente no se tocan. La membrana aletil se ha ido reabsorbiendo, dejando los extremos de los escudetes libres.

En vista dorsal, sin embargo, los escudetes presentan forma de placa y son independientes. (Figura 121). El espacio entre escudetes va haciéndose menor en sentido longitudinal posterior.



Figura 121. Vista dorsal de un juvenil en **Estadio 49**, sometido a tinción azul alcian – rojo alizarina, en la que se perciben los diferentes escudetes dorsales (**SD**) de color morado independientes, con forma de placa y con sus extremos doblados hacia atrás.

En la cabeza, la forma y el número de pínulas varía de unos ejemplares a otros. (Figura 122). Sin embargo el lugar, por el que siguen apareciendo y extendiéndose resulta suficientemente uniforme para confirmar que presentan un patrón de distribución similar en cada uno de los ejemplares, a ambos lados de la cabeza, describiendo un arco, justo por detrás del opérculo y ampliándose desde la zona de los escudetes dorsales (SD) hacia el extremo del morro. (Figura 123).

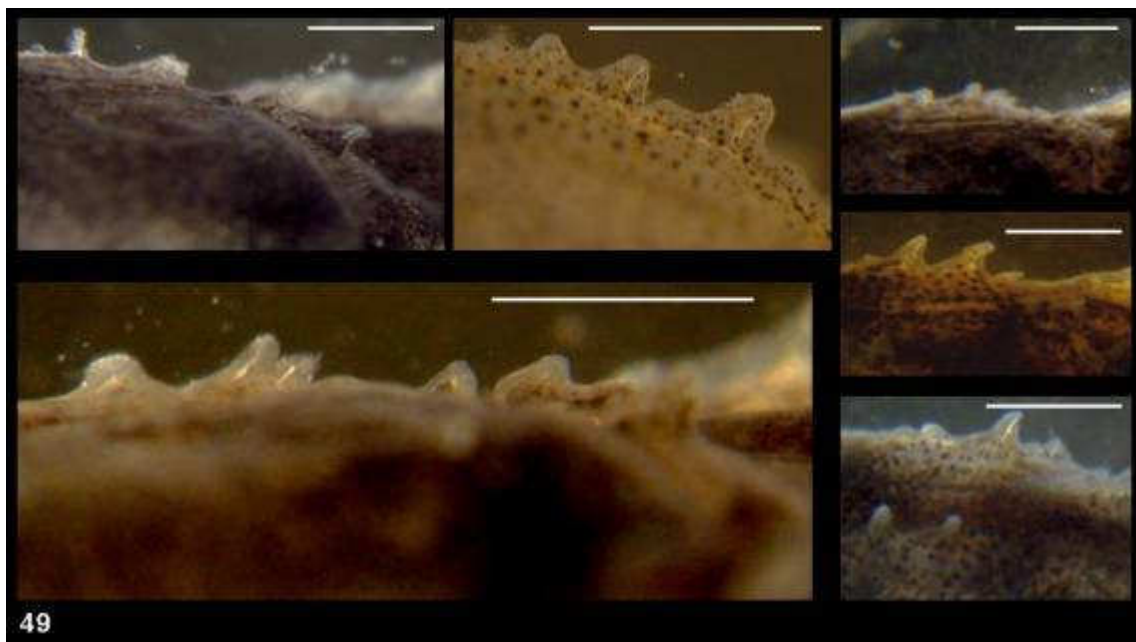


Figura 122. Pinnulas de diferentes ejemplares a diferentes aumentos en juveniles en **Estadio 49**. La línea blanca representa 1 mm.

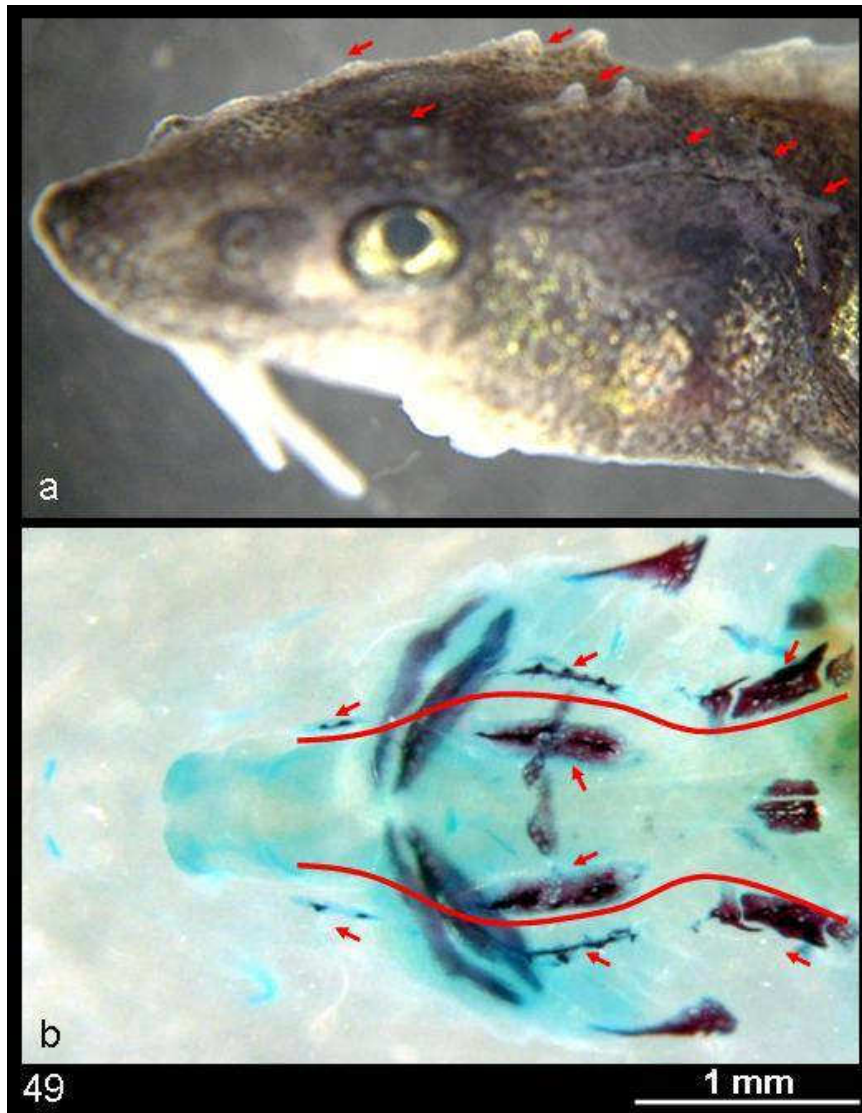


Figura 123. Cabezas de juveniles en **Estadio 49**, en **a)** se señalan con flechas rojas los lugares donde se presentan las pínulas. En la **b)** vista dorsal de la cabeza de un ejemplar sometido a tinción azul alcian – rojo alizarina, las flechas rojas señalan también los lugares de aparición de las pínulas que con la tinción se revelan claramente, y las curvas rojas dibujadas señalan su patrón de formación.

El morro aunque redondeado, va tomando en su extremo una forma más puntiaguda. (Figura 124). En los diferentes ejemplares también ha evolucionado, y podemos diferenciar claramente en la parte superior las narinas y la línea lateral (LL), que se muestra en la vista dorsal de la (figura 124a). En la vista ventral, (figura 124b), también apreciamos parte de la línea lateral (LL) y las cuatro barbillas.

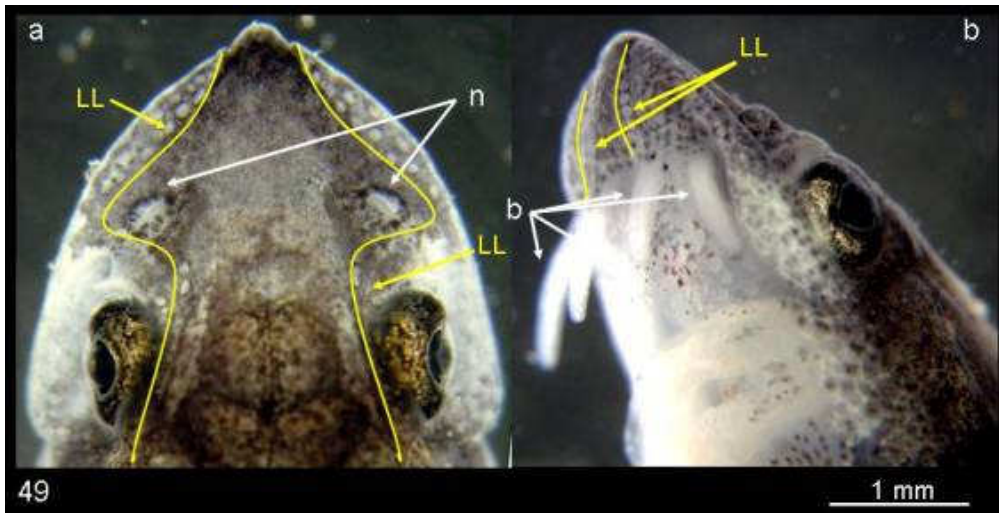


Figura 124. Vista dorsal, **a)** y vista lateral **b)**, del morro de dos ejemplares en **Estadio 49**. En **a)** se ven claramente las narinas (**n**) y se aprecia parte de la línea lateral (**LL**). Se ha señalado su recorrido en color amarillo. En la **b)** se observan las barbillas (**b**) y parte de la línea lateral (**LL**) en su recorrido ventral.

Los dientes de la primera fila mandibular continúan cayéndose, aunque todavía quedan algunos. Por debajo se sitúa la segunda fila de dientes mandibulares y más al fondo se aprecian las branquiespinas (Figura 125). La pérdida de la dentición se extiende en el tiempo, sobrepasando el intervalo de éste y los sucesivos estadios. Se ha visto algún diente en ejemplares de 3 meses de edad (Llorente, 2006).

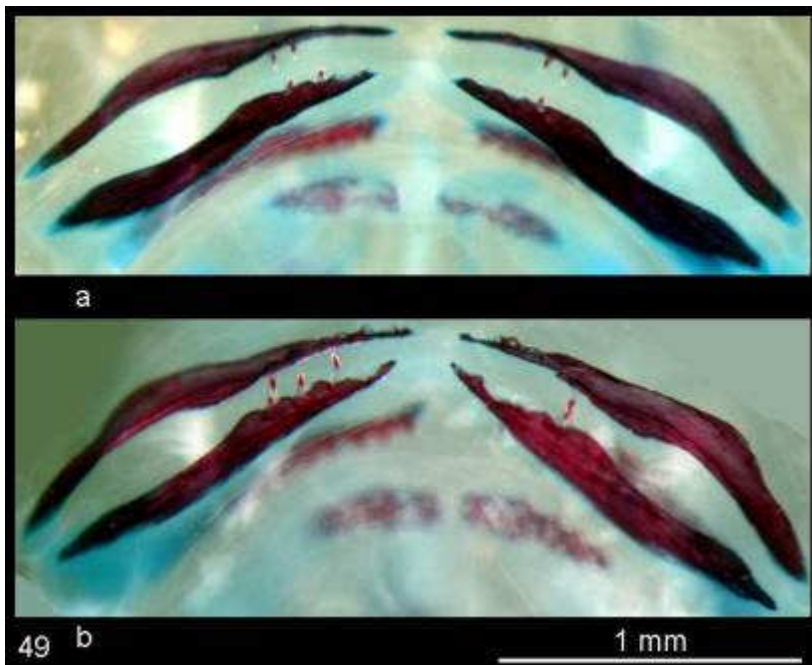


Figura 125. Imagen de las bocas de dos ejemplares en **Estadio 49**, sometidos azul alcian – rojo alizarina, donde se diferencian los dientes que quedan y los huecos que han dejado los que se han caído.



Figura 126. Detalle del opérculo de un ejemplar en **Estadio 49**, donde se aprecian claramente las filas de branquiespinas en la branquia.

Las filas de branquiespinas se distinguen claramente por detrás del opérculo. (Figura 126).

En este estadio se producen cambios importantes a nivel de algunas aletas. Las pectorales parecen haber madurado, aumentan su tamaño y pigmentación y muestran una forma más cercana a la definitiva. La musculatura se ha incrementado observándose claramente la parte correspondiente a los primordios musculares y el área ocupada por los radios en paralelo, que aumenta hasta la mitad de las aletas. Además se van despegando del cuerpo y su forma va siendo menos redondeada, más hidrodinámica y alargada.

(Figura 127).

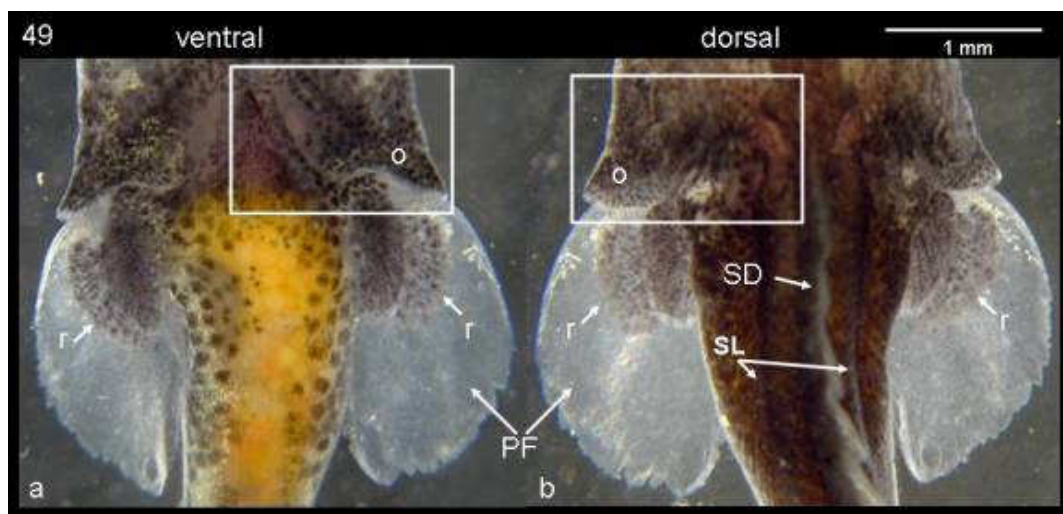


Figura 127. Vista ventral, **a)** y vista dorsal, **b)** de un ejemplar en **Estadio 49**, donde vemos las aletas pectorales (**PF**), sobre la que se señalan sus radios. Además en ambas fotos se muestra la zona del opérculo (**o**) encadrada en blanco. En la vista dorsal se señalan los escudetes dorsales (**SD**) y los laterales (**SL**).

La membrana aletil, que en esta zona estaba unida y en proceso de reabsorción, continúa disminuyendo su tamaño, aumentando la separación entre las aletas dorsal – caudal y anal – caudal aunque todavía no se ha reabsorbido totalmente en la zona del pedúnculo caudal.

La aleta caudal aumenta su tamaño y se estiliza e incrementa su separación de la aleta dorsal al disminuir la superficie de la membrana de la parte dorsal mientras que incrementa la superficie en la porción ventral. La cuerda dorsal que se interna en la aleta

está curvada hacia arriba excepto su extremo final que está doblado hacia abajo. (Figura 128). Al final de este estadio, ya comienzan a distinguirse los radios que soportarán la aleta caudal. En ejemplares sometidos a tinción de azul alcian – alizarina, se observa un desarrollo mayor de los radios de la parte ventral de la aleta (Figura 129). En los ejemplares en fresco, cada vez son más patentes los radios de la aleta así como la pigmentación de la membrana, que va incrementándose gradualmente.



Figura 128. Detalle de la separación de las aletas dorsal (DF), caudal (CF) y ventral (VF). Además se señala parte de la línea lateral (LL) y con flechas negras los radios en la zona dorsal y ventral de la aleta caudal. Obsérvese como el extremo final de la cuerda dorsal se dobla hacia abajo.

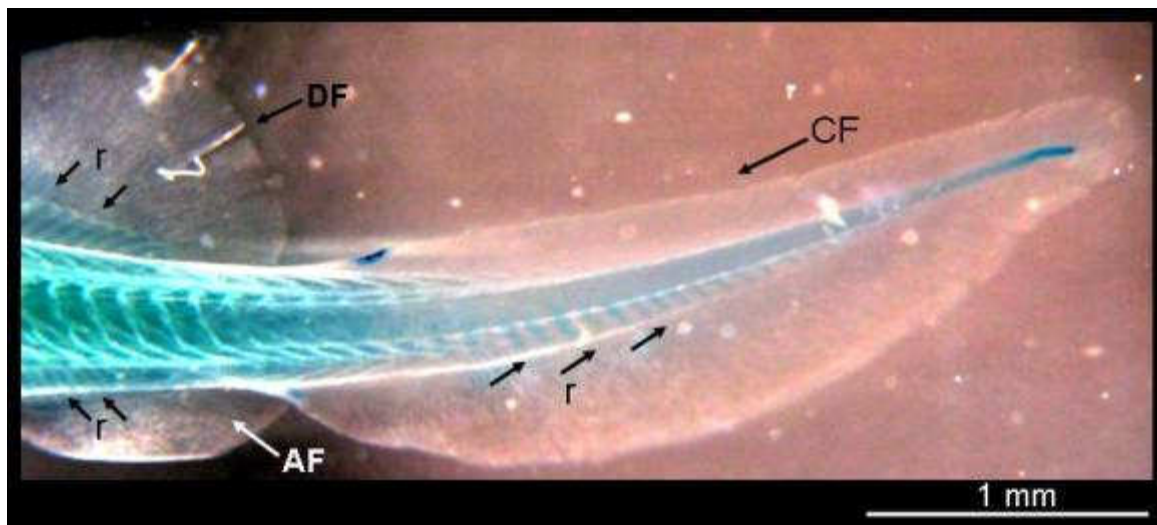


Figura 129. Detalle de la zona caudal de un juvenil en **Estadio 49** sometido a tinción azul alcian – rojo alizarina se señalan con flechas negras los radios en la aleta dorsal (DF), anal (AF) y en la parte ventral de la aleta caudal (CF).

Estadio 50 (26 dpe – 66 dpe)

(≈ entre 1 - 2 meses post – eclosión)

Este estadio se caracteriza principalmente porque aparecen los escudetes laterales (SL) y los escudetes ventrales (SV). Aunque en estadios anteriores las zonas de los mismos estaban representadas por cuatro líneas en tonalidad plateada y brillante muy marcadas, no es hasta este momento cuando aparecen y sobresalen. Además muestran un crecimiento

bastante rápido durante dicho estadio. A diferencia de los escudetes dorsales (SD) que comenzaban a aparecer como una mancha densa en la que después los diferentes escudetes se iban independizando, en los laterales (SL) y ventrales (SV) toda la fila aparece prácticamente al mismo tiempo e incluso antes de hacerlo, se distinguen debajo de la piel doblados como ganchos (Figuras 130 y 131).

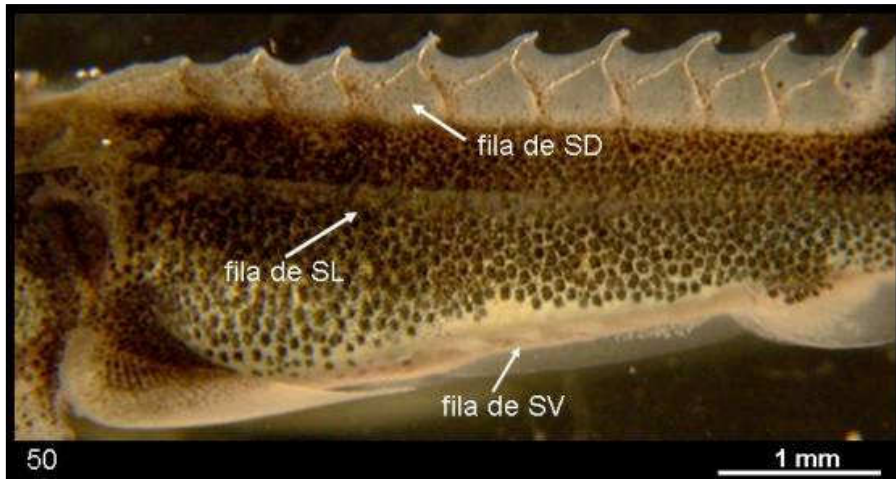


Figura 130. Juvenil en **Estadio 50**, comienzan a aparecer la fila de escudetes laterales (SL) y ventrales (SV). 8X. 26 dpe

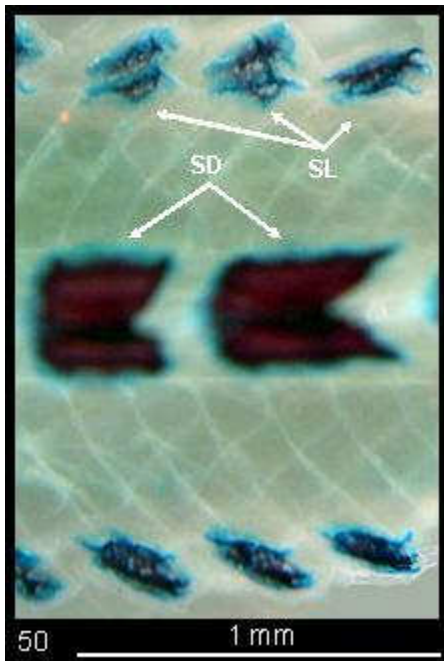


Figura 131. Detalle de escudetes dorsales y laterales de un juvenil en **Estadio 50** en tinción azul alcian-rojo alizarina. Los escudetes laterales (SL) muestran forma de ganchos aparecen por debajo de la piel. 40X

A partir de aquí los cambios en los SD se ralentizan bastante. La membrana se sigue reduciendo, y casi ha desaparecido a los 36 dpe, (\approx 1 mes pe) la base se continúa ensanchando y aplanando, y tanto los SL como los SV continúan su crecimiento. (Figuras 132 y 133).

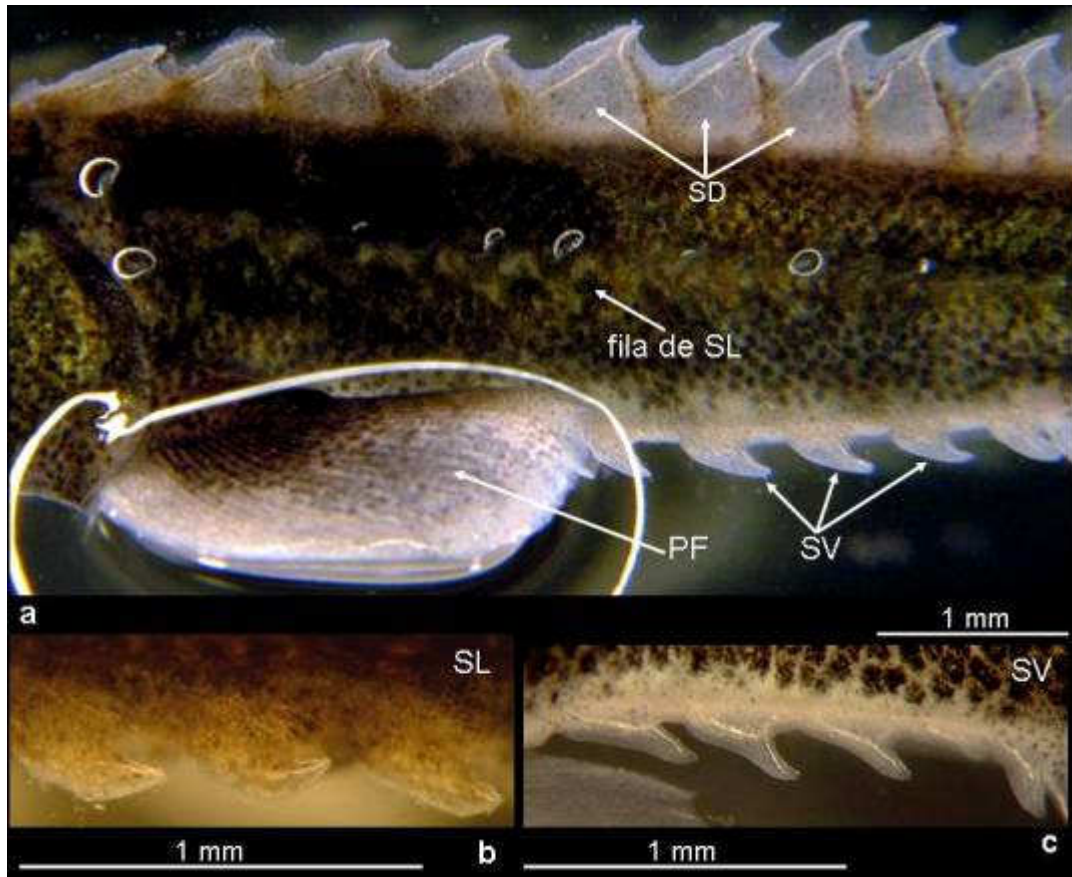
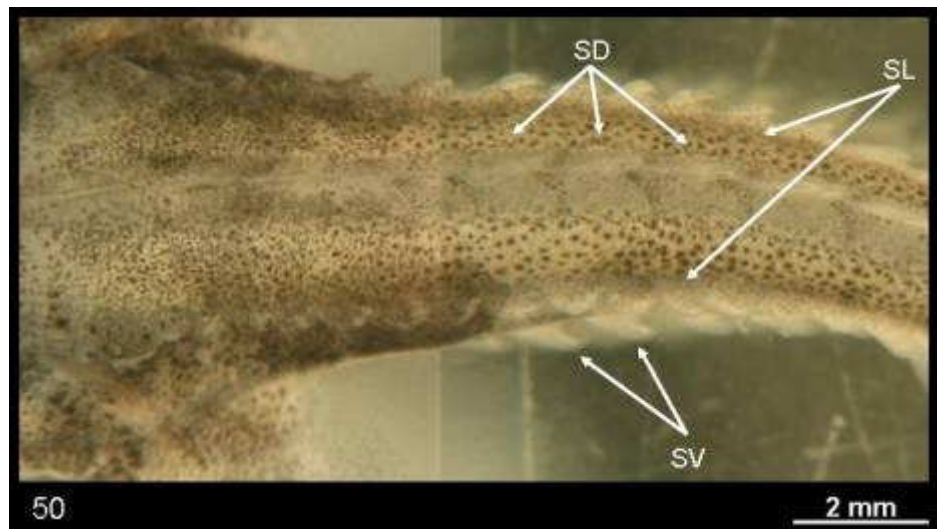


Figura 132. Juvenil en **Estadio 50** a los 36 dpe: **a)** la membrana aletil prácticamente ha desaparecido dejando libre los escudetes dorsales, 8X. Se señala la aleta pectoral (**PF**) paralela al cuerpo. **b y c)** muestran un detalle de los escudetes laterales (**SL**), doblados como ganchos, 40X, y los escudetes ventrales (**SV**), 25X respectivamente.

Figura 133. Juvenil en **Estadio 50** donde se aprecian los SD con su base más ancha y aplanada. También se observan los escudetes laterales (SL) y los ventrales (SV) más doblados.



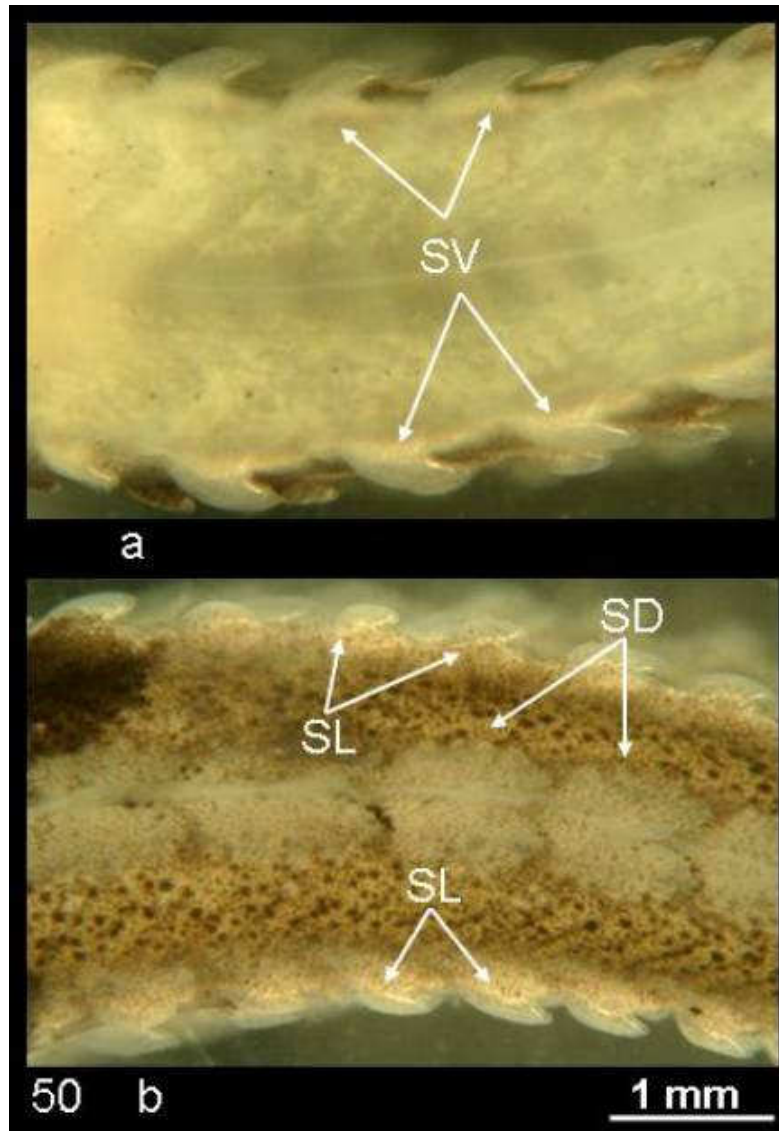


Figura 134. Juvenil en **Estadio 50**, **a)** vista ventral, (**SV**) que han crecido y se aprecian más doblados hacia atrás. **b)** vista dorsal, (**SL**) y (**SD**).

A los 66 dpe, (\approx 2 meses) en vista dorsal, (Figura 134b), los escudetes se aprecian como placas con el extremo en punta más reducido porque continúan doblándose hacia atrás. Ahora la base de los SD presenta una forma más irregular que antes, que era más recta. Los SV también se muestran más doblados. (Figura 134a).

En cuanto a la cabeza, ya habíamos apuntado que en el estadio anterior el morro aunque redondeado tomaba en su extremo forma más puntiaguda. Ahora, en este estadio, podemos apreciar la plasticidad que muestran los diferentes ejemplares en cuanto al morro. (Figura 135 y 136). En la (Figura 135a y d) aunque muy parecidas entre ellas en la curvatura del morro, su extremo final es más puntiagudo y continuado en la (Figura 135d). Las (Figuras 135b y c) muestran morros muy parecidos entre ellos pero en detalle la (Figura 135c) muestra un morro y punta del mismo más redondeados que el resto.



Figura 135. Morros de juveniles en **Estadio 50** donde se puede apreciar la plasticidad característica del género *Acipenser* y en concreto de la especie *A. naccarii* en ejemplares de 2 meses (**pe**). Aunque dicha especie se caracteriza por su morro redondeado vemos que existe variación en los extremos de los mismos para ejemplares de dos meses post - eclosión. 8X

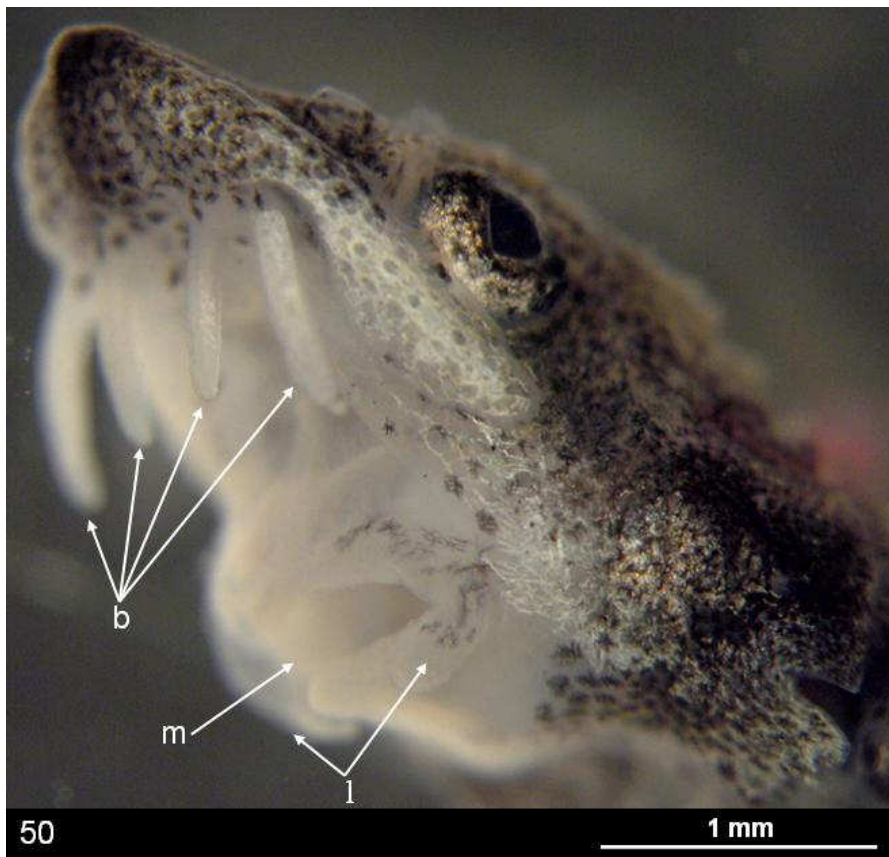


Figura 136. Vista lateral del morro de un juvenil en **Estadio 50** donde se distinguen las cuatro barbillas (b) y la boca protráctil (m) en la que a simple vista no se aprecian dientes. También se distinguen claramente los labios (l). 20X

Las pínulas aumentan en número y se extiende hacia el morro y por detrás del opérculo. (Figuras 137, 138 y 139). El sistema quimiorreceptor de la línea lateral también es visible y se extiende en la zona ventral desde el extremo del morro hacia las barbillas a las que rodea y continúa bajando hacia la boca para después subir por detrás de las narinas y

por delante de los ojos rodeándolos por su parte superior, siguiendo por las pinnulas que se extienden hacia los escudetes laterales. (Figura 137b, 138b y 139b).

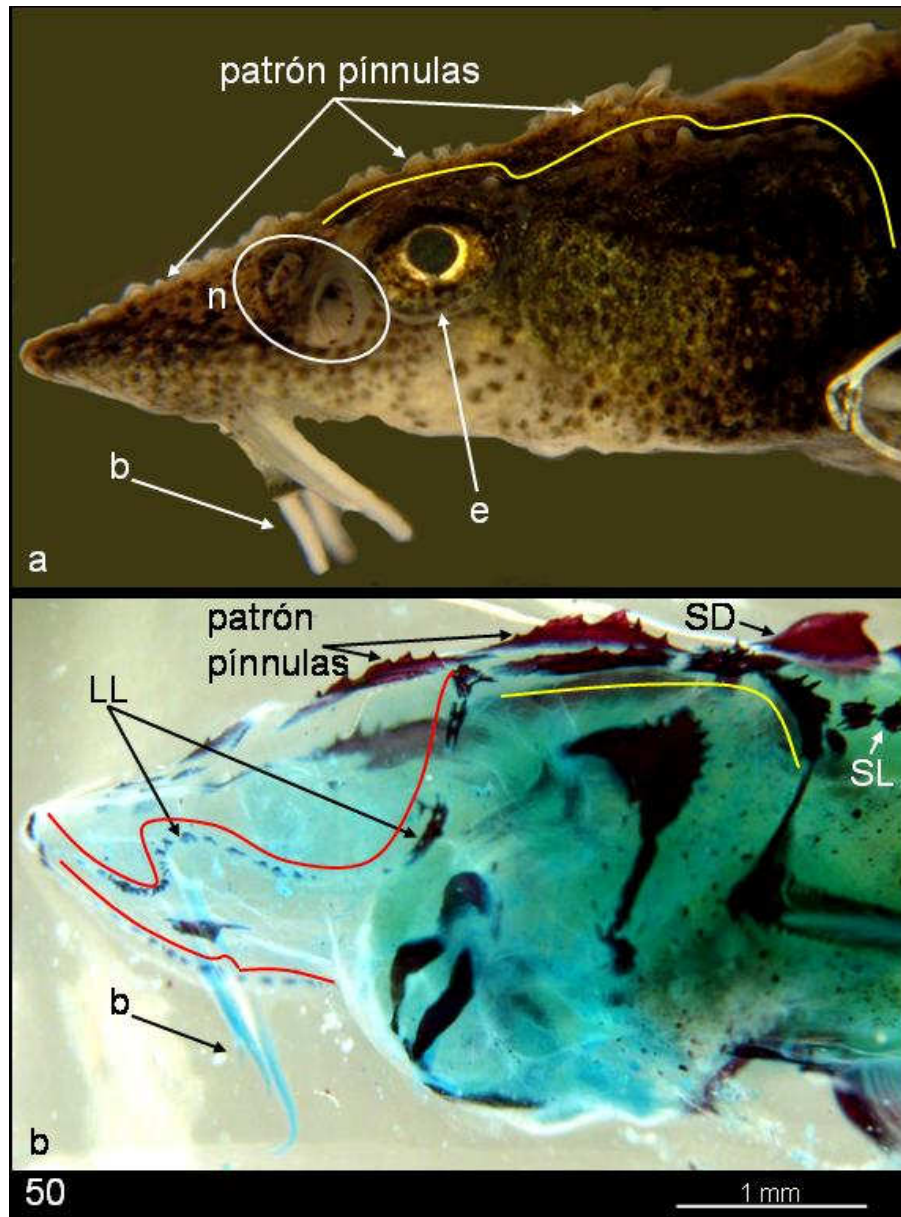


Figura 137. a) Vista lateral de la cabeza de un juvenil en **Estadio 50** en el que pueden observarse claramente las pinnulas que sobresalen y el patrón que siguen.

Extendiéndose hacia el morro se observa las más dorsales y mediante la línea amarilla se señalan las que rodean al ojo y se extienden por detrás del opérculo. En una elipse blanca se señalan las narinas, (n). También se muestran las barbillas (b) y el ojo (e). **b)** Vista lateral de un juvenil en **Estadio 50**, sometido a tinción azul alcian – rojo alizarina, donde se ve claramente el patrón de pinnulas y el sistema quimiorreceptor de la línea lateral señalada en rojo.

12.5X

Figura 138. a) Vista dorsal de un ejemplar en **Estadio 50** en el que se señalan las narinas (**n**) y se señala de amarillo el patrón que siguen las pinnulas a lo largo de la cabeza. **b)** Ejemplar sometido a tinción azul alcian – rojo alizarina, donde por transparencia observamos el sistema quimiorreceptor de la línea lateral (**LL**) e igualmente señalado de amarillo se resalta el patrón de pinnulas (**p**). 8X

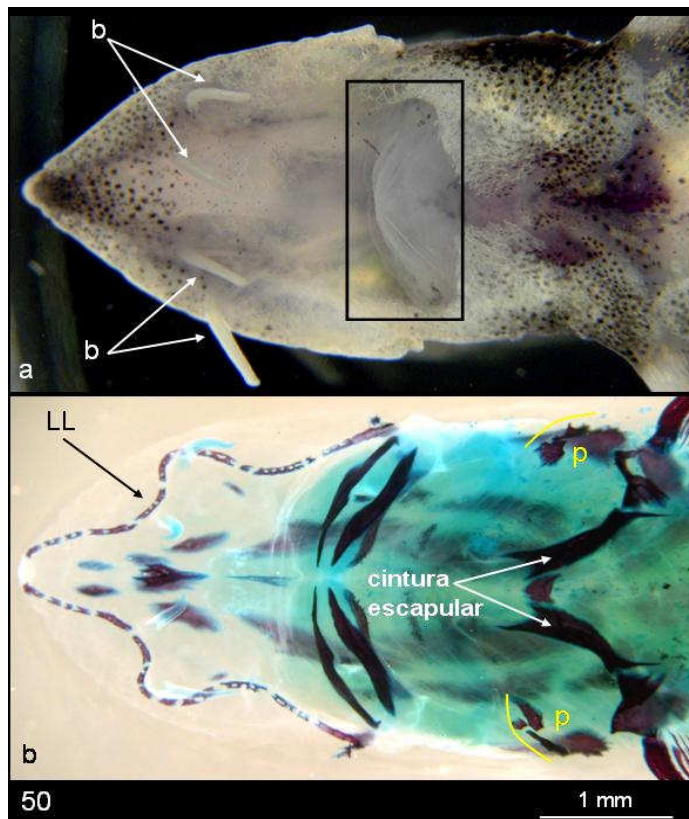
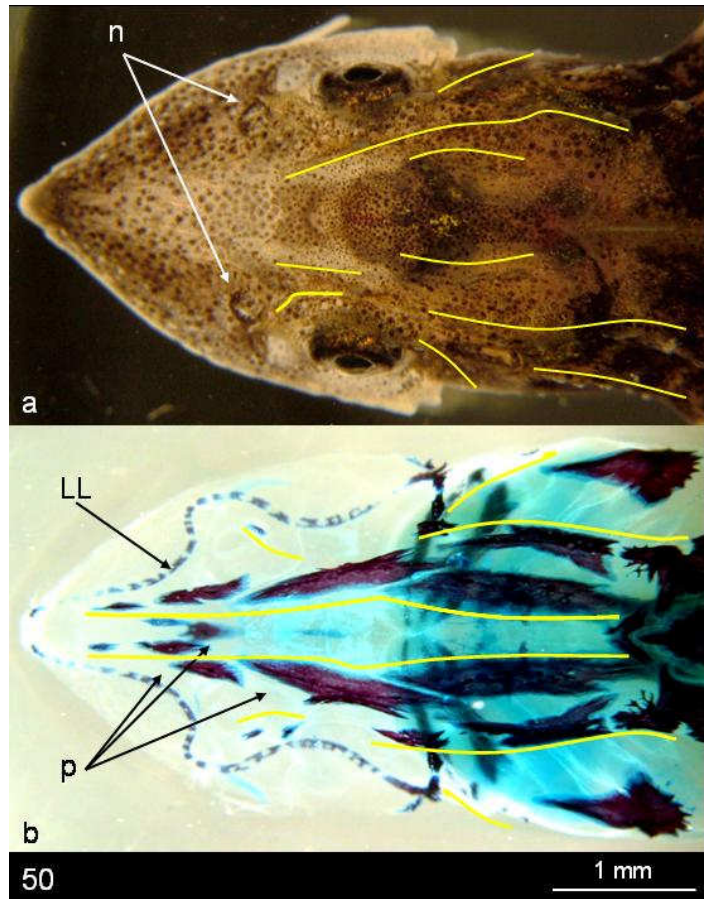


Figura 139. a) Vista ventral de un ejemplar en **Estadio 50** en el que claramente observamos la forma redondeada del morro y hemos señalado las barbillas así como encuadrado la boca. En **b)** tenemos un ejemplar sometido a tinción azul alcian – rojo alizarina donde se distinguen claramente el sistema quimiorreceptor de la línea lateral (**LL**) y por transparencia el patrón de pinnulas de la cabeza. Se ha señalado de color amarillo las pinnulas que se extienden por detrás del opérculo y la cintura escapular. Además se puede observar que en las placas mandibulares no se aprecian dientes.

La forma de las aletas pectorales no ha variado en este estadio aunque parecen más robustas. Además la pigmentación y los radios se extienden cubriendo más de la mitad de las aletas. Prácticamente quedan sin cubrir los bordes de las mismas. (Figuras 140 y 141).

Figura 140. a) Vista dorsal de las aletas pectorales de un juvenil en **Estadio 50** de 50 dpe. Se puede apreciar como los radios han crecido y la pigmentación de la aleta también ha aumentado cubriendo más de la mitad de la misma. **b)** Vista ventral de otro ejemplar de 50 dpe sometido a tinción azul alcian – rojo alizarina, donde se observan claramente los radios de las aletas pectorales

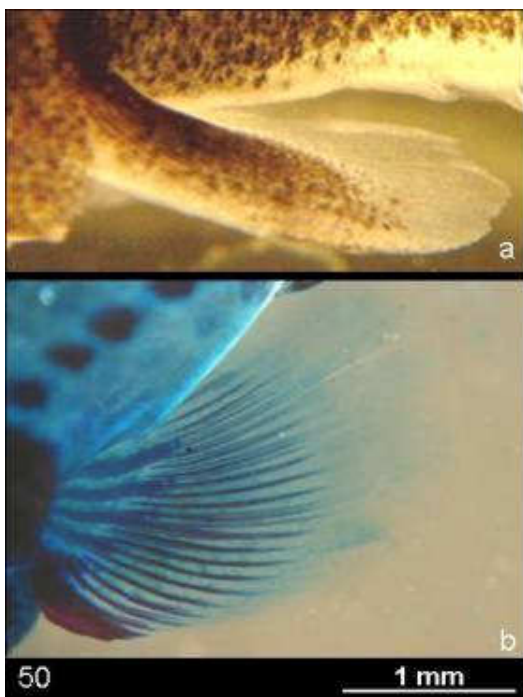


Figura 141. a) Vista dorso – lateral de un ejemplar en **Estadio 50** en la que se puede ver la forma y pigmentación de una de las aletas pectorales. **b)** Vista dorsal de la aleta de un ejemplar sometido azul alcian – rojo alizarina donde se muestran claramente los radios. 10X

Las aletas ventrales van evolucionando a lo largo de este estadio hasta adquirir finalmente la forma definitiva. Al principio presentan una forma lanceolada con una parte más redondeada y los extremos libres acabados en punta. La pigmentación que al inicio del estadio apenas cubre la mitad de las aletas, se va incrementando y al final del mismo quedan prácticamente cubiertas. De igual modo los radios van creciendo hasta casi alcanzar los bordes de las aletas. (Figura 142).

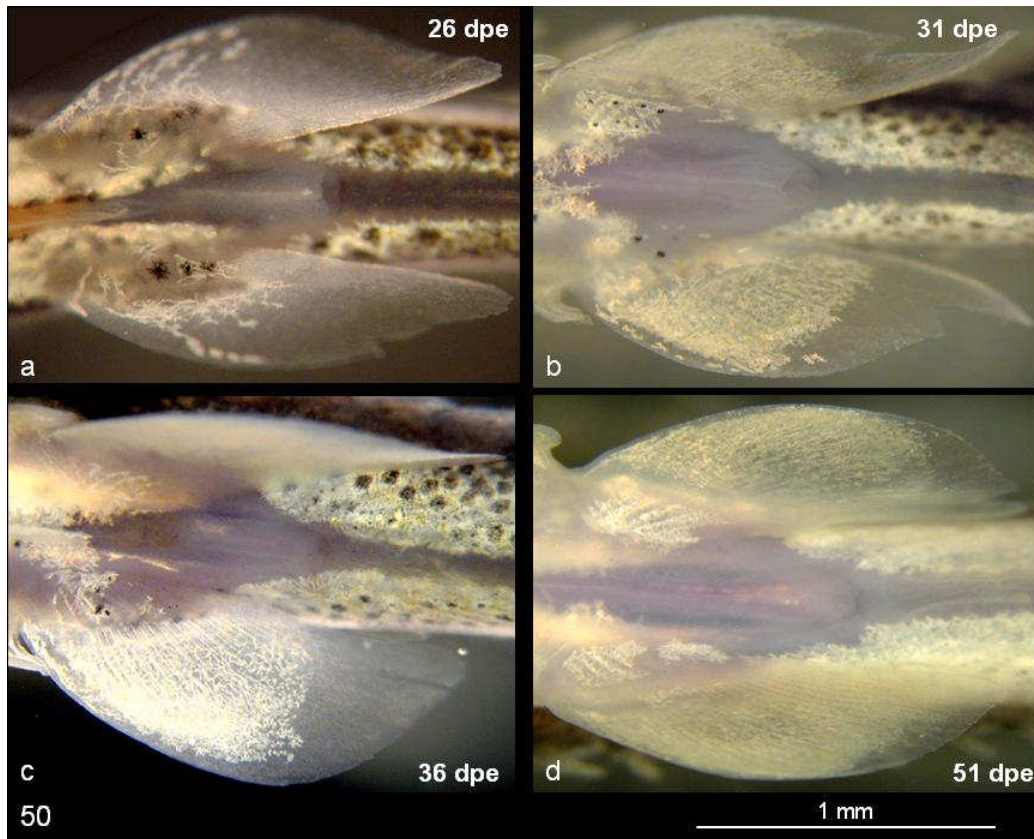


Figura 142. Evolución de las aletas ventrales a lo largo del **Estadio 50**, desde los 26 dpe hasta los 51 dpe, donde los radios casi alcanzan el borde distal posterior de la aleta. 40X.

Las aletas dorsal y anal también experimentan cambios importantes dentro de este estadio. (Figura 143). En general, ambas aletas desarrollan una forma más independiente e hidrodinámica. La pigmentación se extiende a lo largo y ancho de las aletas. A los 26 dpe (Figura 143a), apenas cubre algo más que los radios, mientras que al final de dicho estadio, a los 51 dpe (Figura 143d) cubre más de la mitad de las aletas siendo la pigmentación más intensa en la aleta dorsal que en la anal. Las dos aletas como ya hemos indicado anteriormente se han separado de la aleta caudal que a su vez se ha ido reabsorbiendo en su parte anterior dejando libre el pedúnculo caudal. La aleta anal (aF), muestra claramente los radios y en este estadio la membrana en su parte anterior va desapareciendo como indican las flechas rojas (Figuras 143a y b) hasta obtener la separación completa de la aleta preanal PraF. (Figuras 143c y d). Además, en muchos ejemplares, en la zona ventral del

pedúnculo caudal entre las aletas preanal y anal, ya separadas, comienzan a formarse escudetes ventrales (SV), son escudetes postanales y pinnulas alrededor de los mismos. (Figura 143c).

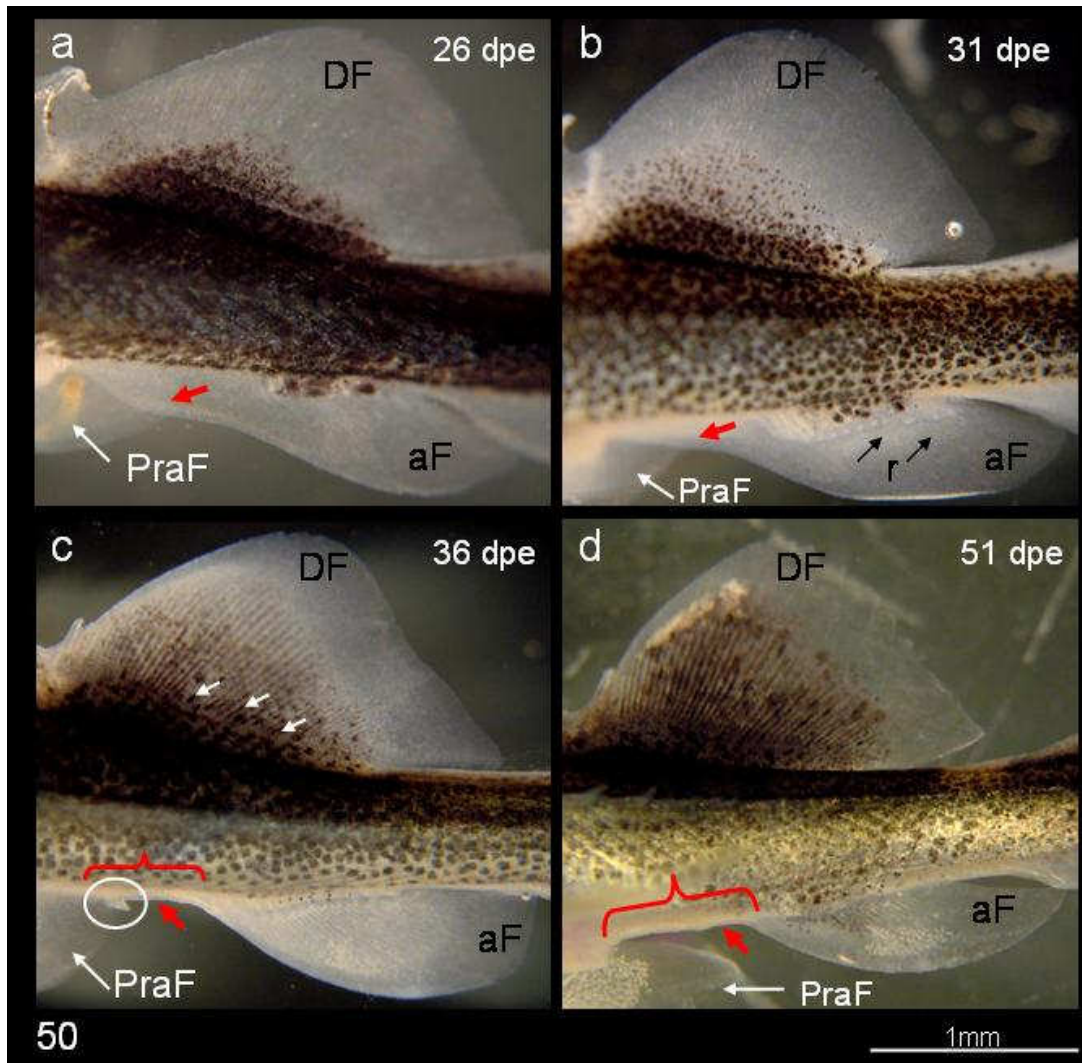


Figura 143. Evolución de las aletas dorsal y anal a lo largo del **Estadio 50**.

En cuanto a la aleta caudal siguen produciéndose cambios aunque no demasiado bruscos. A los 36 dpe, (\approx 1 mes), los radios cada vez son más patentes y la pigmentación se incrementa gradualmente. (Figura 144a y b). A los 50 dpe, los radios son patentes en toda la aleta caudal y en todos los ejemplares, quedando claramente marcado el lóbulo final. (Figura 145 a y b).

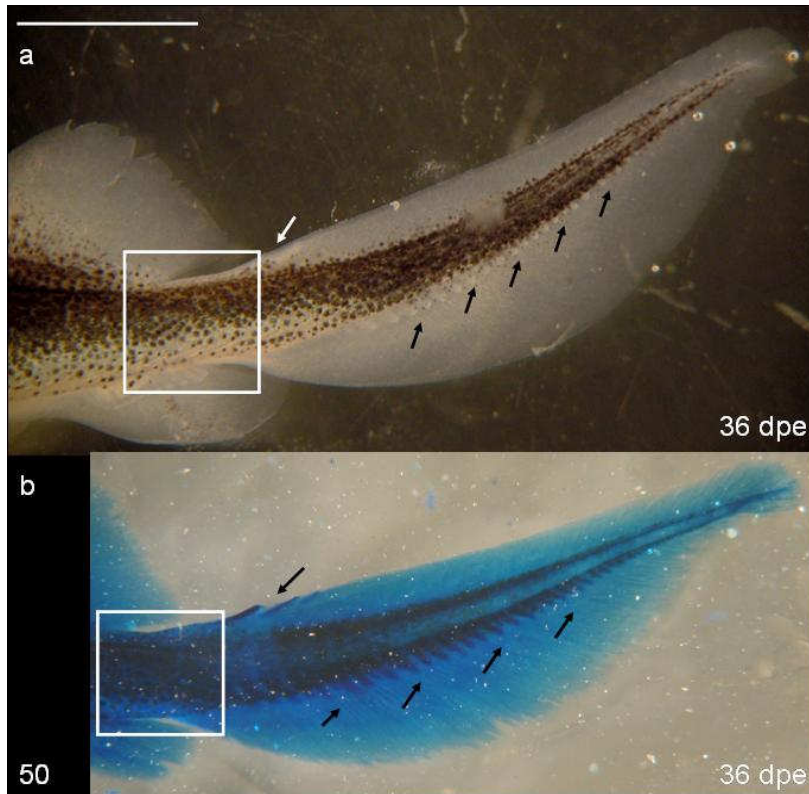
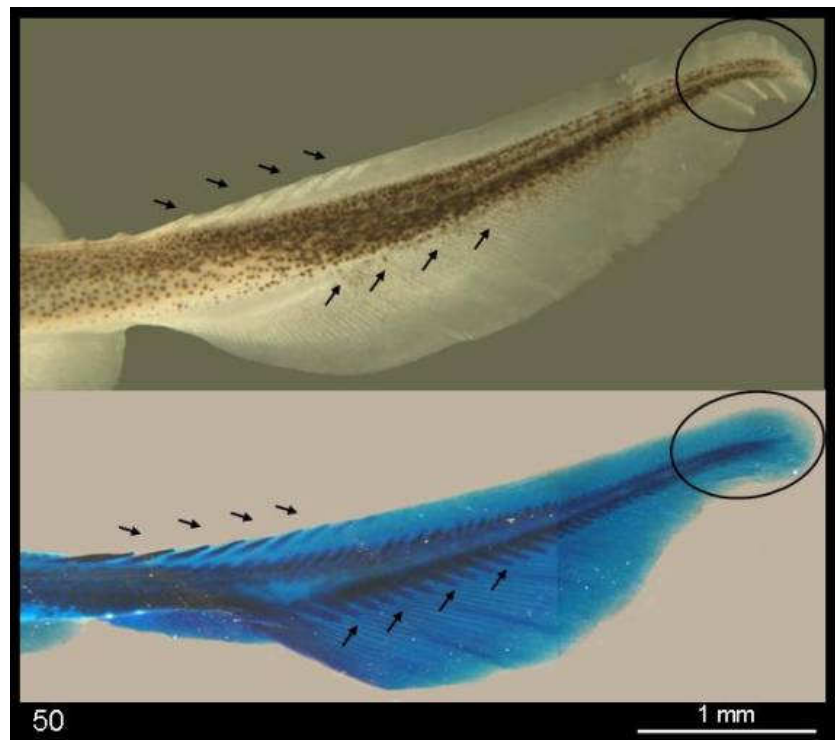


Figura 144. Detalle de la zona caudal de dos juvenil al final del **Estadio 50**, a los 36dpe, **a)** en fresco, **b)** sometido a tinción azul alcian – rojo alizarina. En ambos se señalan con flechas negras los radios que comienzan a formarse en la parte superior de la aleta caudal y los ya formados en la parte inferior de la misma. En ambas zonas encuadradas en blanco se detalla la separación entre aletas dorsal y caudal, y aletas anal y caudal. La línea blanca representa 1 mm, 8X.

Figura 145. Aleta caudal de dos juvenil en Estadio 50, a los 51 dpe, el de arriba sin teñir y en la parte de abajo uno sometido a tinción azul alcian – rojo alizarina. En ambos se revelan claramente los radios.



Estadio 51 (66 dpe – 81 dpe)

(2 – 3 meses post – eclosión)

A lo largo de las siguientes semanas, entre los 2 – 3 meses post – eclosión, los escudetes laterales (SL), al igual que los dorsales (SD), irán ensanchando y aplanando su base a la vez que doblando sus extremos hacia atrás. El extremo en punta característico de los escudetes, va desapareciendo en los más cercanos a la región caudal pero aún permanece en los escudetes más próximos a la cabeza (Figura 146 y 147). La punta se irá reduciendo hasta encontrarse que al principio del tercer mes los escudetes más cercanos a la aleta caudal están totalmente transformados en placas mientras que los más anteriores conservan aún el extremo doblado hacia atrás.

A los 3 meses los escudetes dorsales primarios (SD1^o) quedan perfectamente formados, adquiriendo la morfología que se mantendrá en el adulto. (Figura 148).

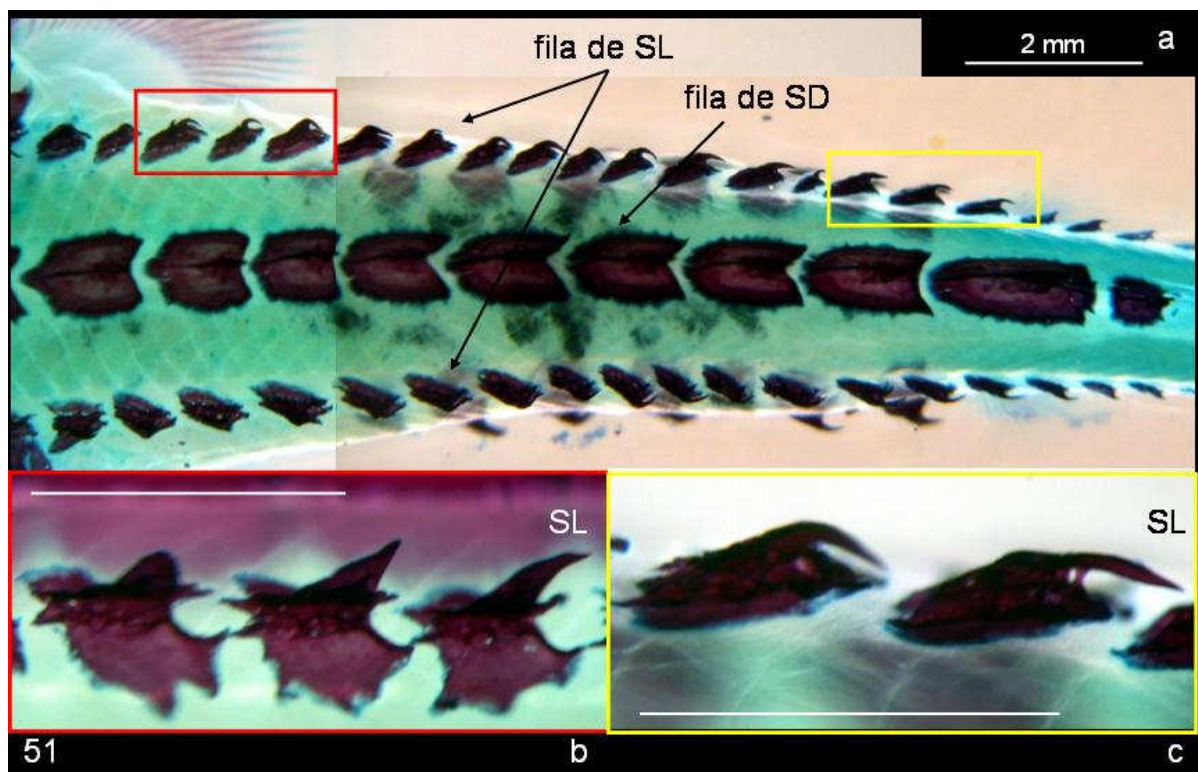


Figura 146. Juvenil en **Estadio 51** sometido a tinción azul alcian – rojo alizarina donde se observan: **a)** la fila de escudetes dorsales (**SD**) y las dos filas de escudetes laterales (**SL**), **b)** detalle de escudetes laterales (**SL**) de la región anterior que presentan una forma más puntiaguda, encuadrados en rojo y **c)** detalle de los escudetes laterales (**SL**) de la región más caudal cuyos extremos se encuentran más doblados presentando una forma más aplanada, encuadrados en amarillo. En b y c, la línea blanca representa 1mm.

Los escudetes ventrales (SV), sin embargo, presentan todavía una forma más punzante, (Figura 147), y continúan apareciendo escudetes secundarios (SD^{2°}). (Figura 149 y 150).

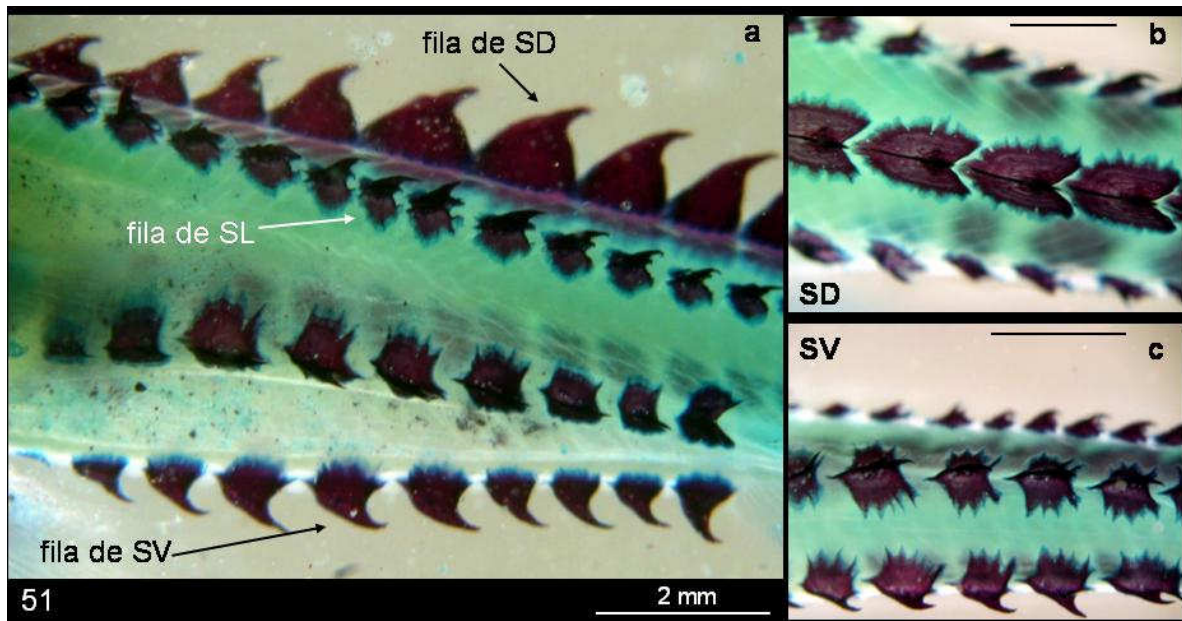


Figura 147. Juvenil en **Estadio 51** sometido a tinción azul alcian – rojo alizarina, donde **a)** vista lateral con fila de escudetes dorsales (**SD**), laterales (**SL**) y ventrales (**SV**), **b)** detalle de los escudetes dorsales (**SD**) su base ahora es más festoneada y **c)** detalle escudetes ventrales (**SV**) forma estrellada. Donde la línea negra en b y c representa 1 mm.

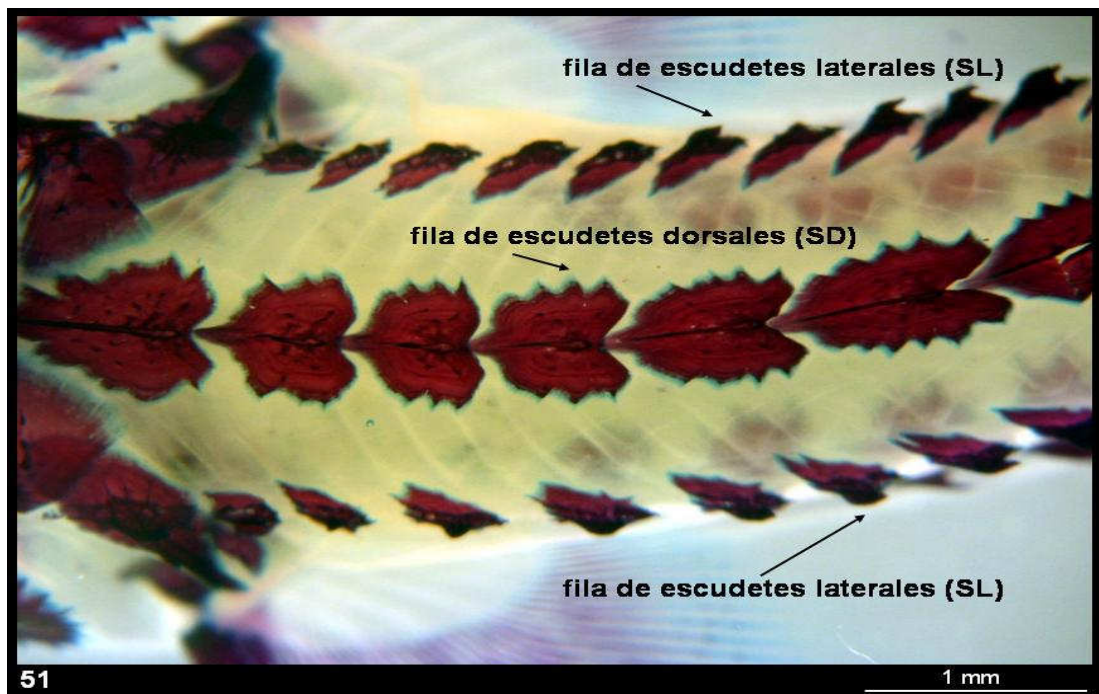


Figura 148. Vista dorsal de un juvenil en **Estadio 51** (de 3 meses de edad), sometido a tinción azul alcian – rojo alizarina, donde observamos la evolución de los escudetes dorsales (**SD**) y laterales (**SL**) que van adquiriendo la forma de placas características de los adultos.

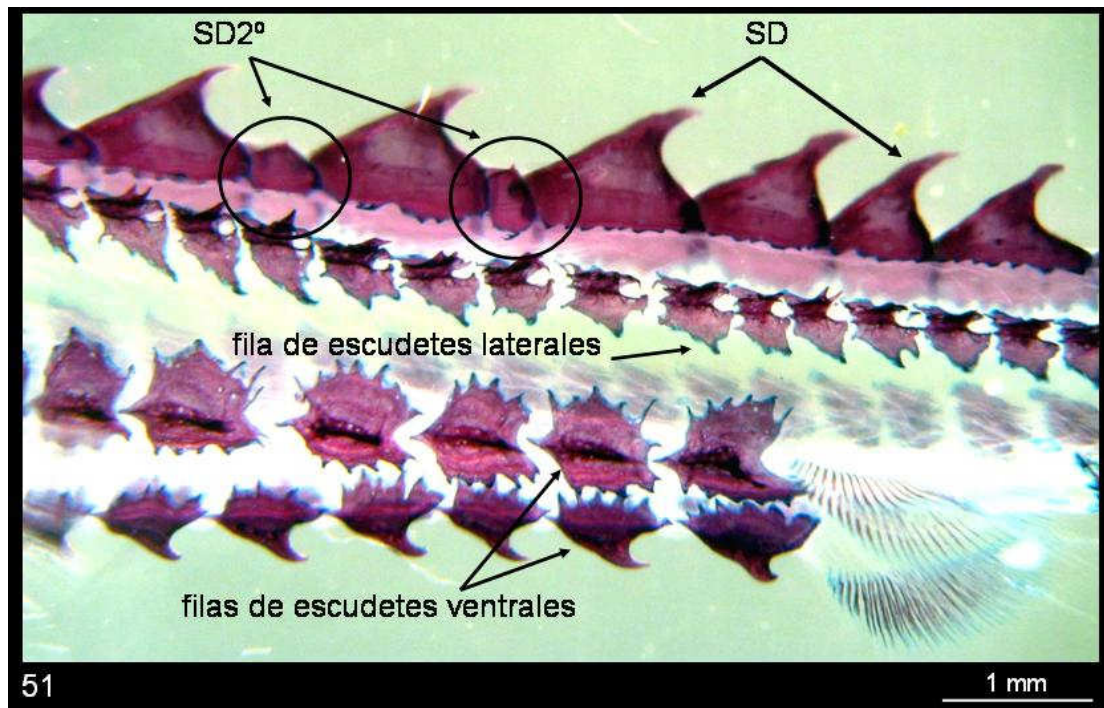


Figura 149. Vista lateral de dos escudetes dorsales secundarios ($SD\ 2^\circ$), rodeados en negro, entre los escudetes primarios (SD) en un juvenil en **Estadio 51** (de 3 meses de edad), sometido a tinción azul alcian – rojo alizarina, también se señalan las filas de escudetes laterales y ventrales.

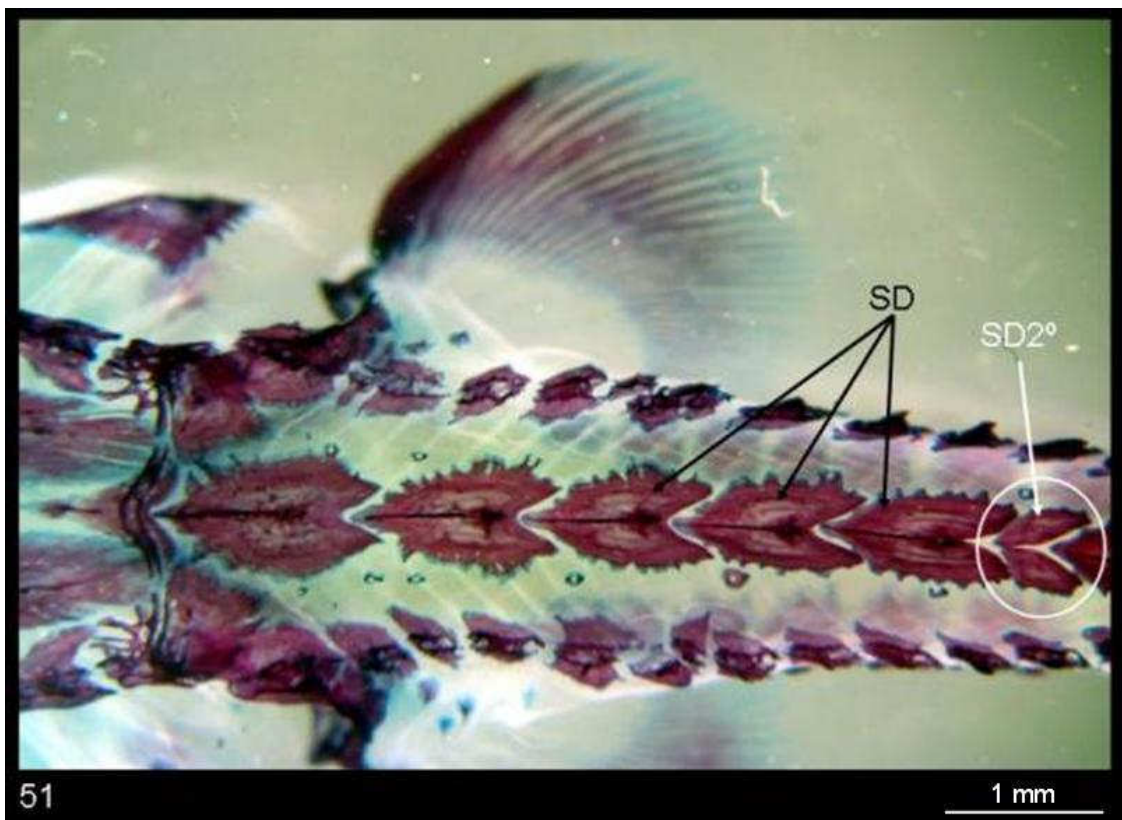


Figura 150. Vista dorsal de un escudete dorsal secundario ($SD\ 2^\circ$) entre dos escudetes primarios en un juvenil en **Estadio 51** (de 3 meses de edad), sometido a tinción azul alcian – rojo alizarina.

Los escudetes dorsales primarios (SD^{1°}), así como los laterales y ventrales quedan perfectamente formados a lo largo de este estadio. (Figura 151).

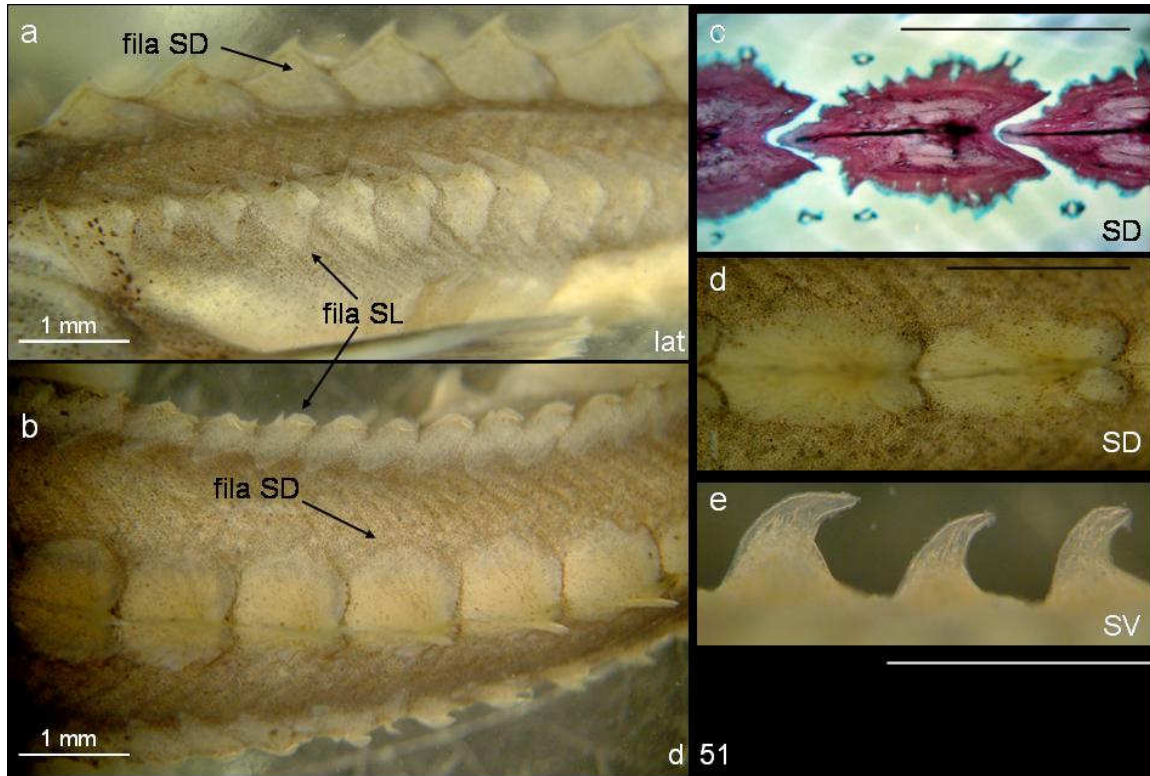


Figura 151. Escudetes de un juvenil en **Estadio 41.** **a)** Vista lateral donde se señalan los **SD** y los **SL** con la forma característica de placa. **b)** Vista dorsal de los **SD** y **SL**, que aunque en la vista lateral se ven con forma de placa podemos distinguir todavía los ganchos, cada vez más doblados. **c)** detalle de los **SD** sometidos a tinción azul alcian – rojo alizarina. **d)** detalle de la forma de los **SD** sin teñir. **e)** detalle de los **SV** en vista lateral. Las líneas representan 1 mm.

Además, en la zona ventral entre las aletas preanal y anal ya separadas, se forman escudetes ventrales y pínulas alrededor de los mismos. Se observó que el patrón de distribución de los escudetes no era constante, ni en número, ni en los “dibujos” que formaban junto a las pínulas, variando de unos ejemplares a otros. (Figuras 152 y 153).

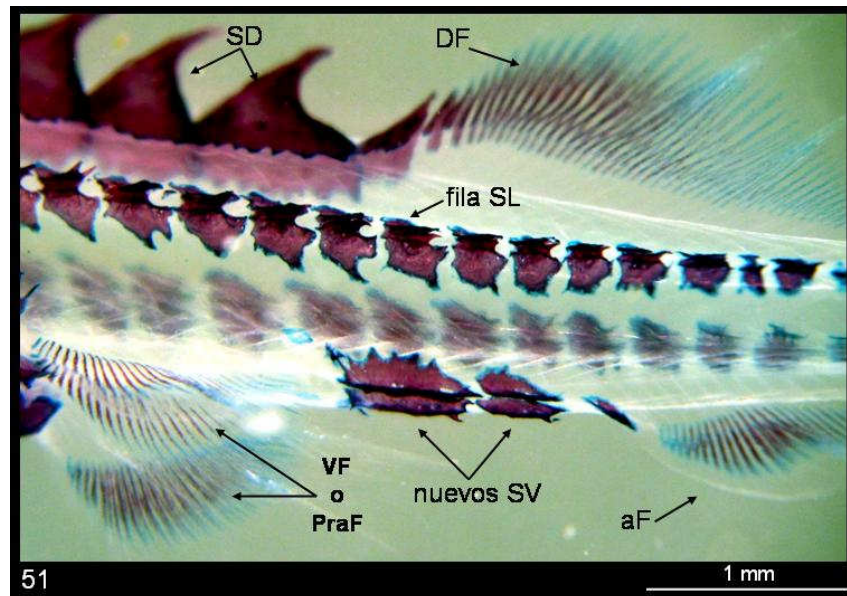


Figura 152. Detalle de los (SV) escudetes ventrales formados entre las aletas ventrales (VF) y anal (aF) en un ejemplar en **Estadio 51**.

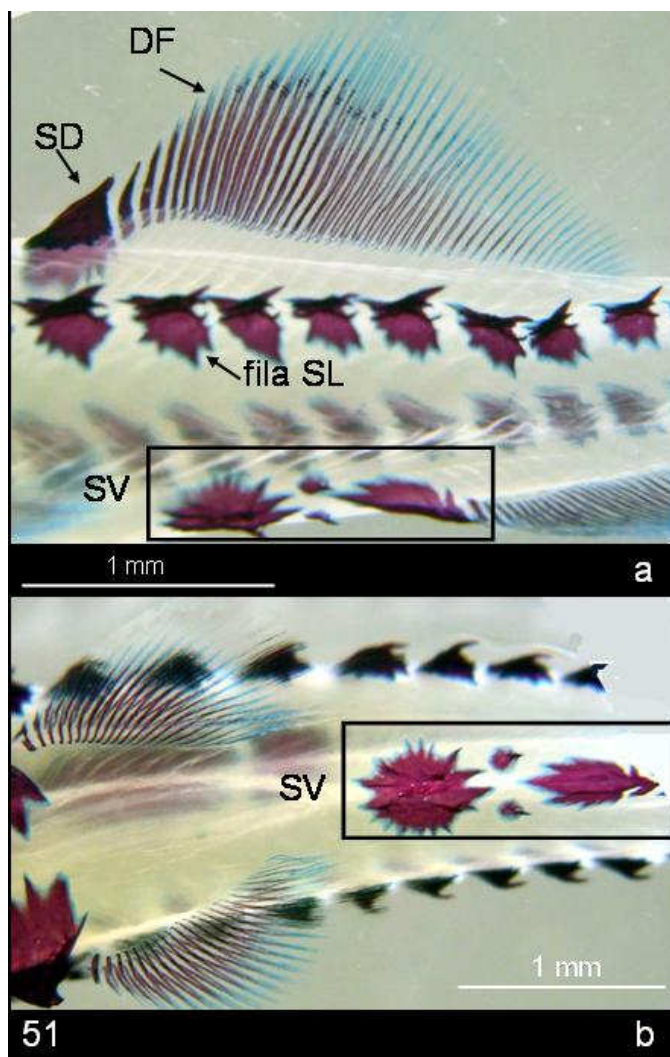


Figura 153. a) Vista lateral de un ejemplar en **Estadio 51**, sometido a tinción azul alcian - rojo alizarina, donde se destacan encuadrados el dibujo de los escudetes ventrales (SV) y las pinnulas que aparecen detrás de las aletas ventrales. **b)** detalle de los (SV) y pinnulas en vista ventral.

Durante este estadio los esturiones alcanzan la forma que mantendrán en los adultos. Así la estructura y forma de la cabeza, los ojos, narinas, barbillas, línea lateral aparecen completamente formadas, al igual que toda la cabeza que aparece cubierta de pínulas hasta el morro. (Figuras 154 y 155).

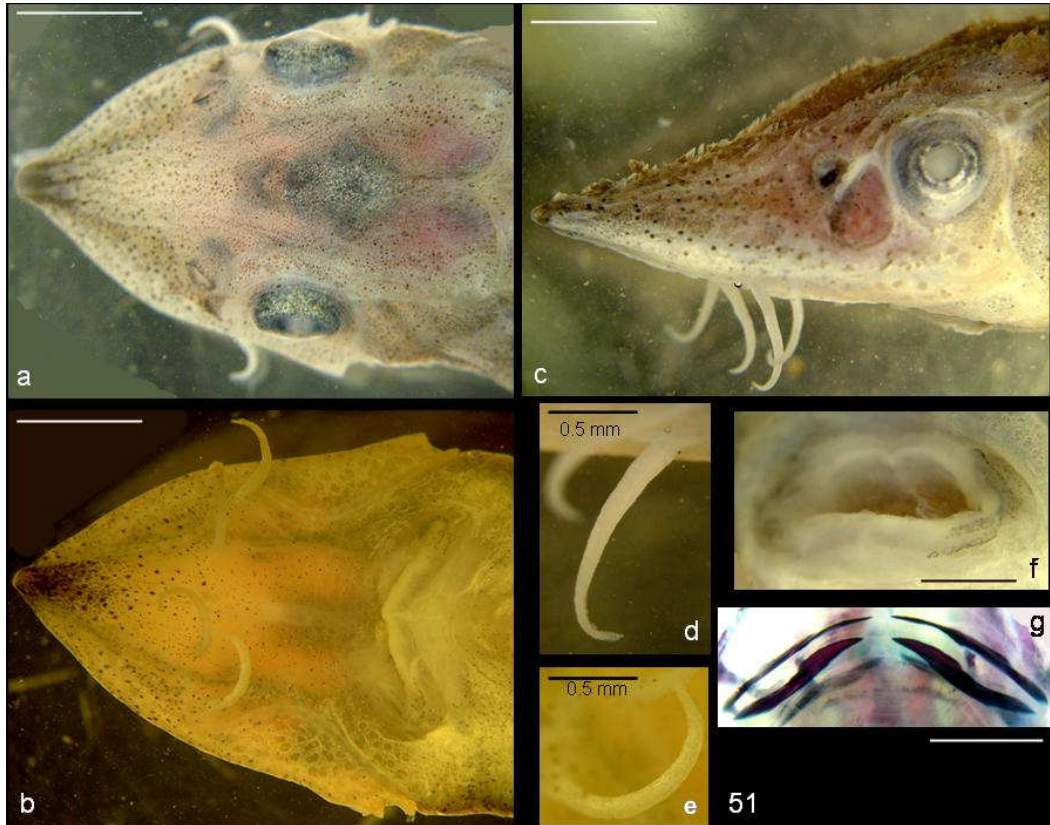


Figura 154. Juvenil en Estadio 51. **a)** Vista dorsal de la cabeza; **b)** Vista ventral, donde se aprecian claramente las 4 barbillas, dos centrales algo más adelantadas que las dos laterales, se aprecia el sistema de la LL y la boca. **c)** Vista lateral, donde distinguen las narinas, el patrón de pínulas que baja hasta el morro y las barbillas. **d)** y **e)** detalle de las barbillas. **f)** y **g)** detalle de la boca sin tinción y con tinción azul – alcian – rojo alizarina, no se observan dientes.

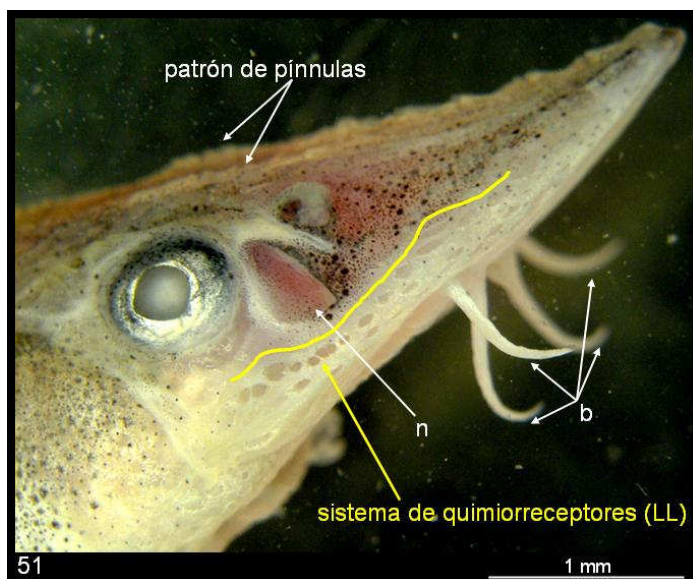


Figura 155. Vista lateral de un juvenil en Estadio 51, podemos apreciar la forma redondeada del morro, el sistema de quimiorreceptores de la línea lateral (LL), en color amarillo, el patrón de pínulas, las narinas y las barbillas. 25X

En cuanto a las aletas, tanto las pectorales (Figura 156) como las ventrales (Figura 157) presentan su forma definitiva. Las pectorales presentan una forma muy hidrodinámica, alargadas, robustas y paralelas al cuerpo. Los radios casi alcanzan los bordes y la piel las cubre totalmente. (Figura 156). Las ventrales aparecen también cubiertas totalmente por la piel y los radios al igual que en las pectorales casi llegan al borde. (Figura 157).

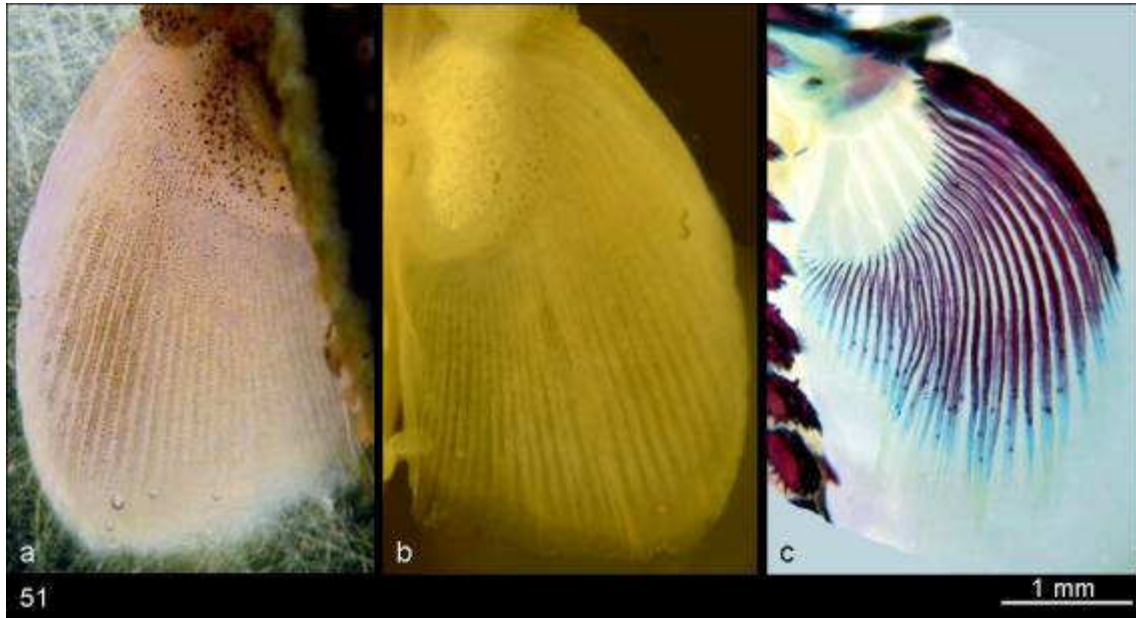


Figura 156. Aletas pectorales de un juvenil en Estadio 51, a) vista dorsal, b) vista ventral y c) vista dorsal con tinción azul – alcian – rojo alizarina. En las tres se distingue la estructura de la yema de la que parten los radios.

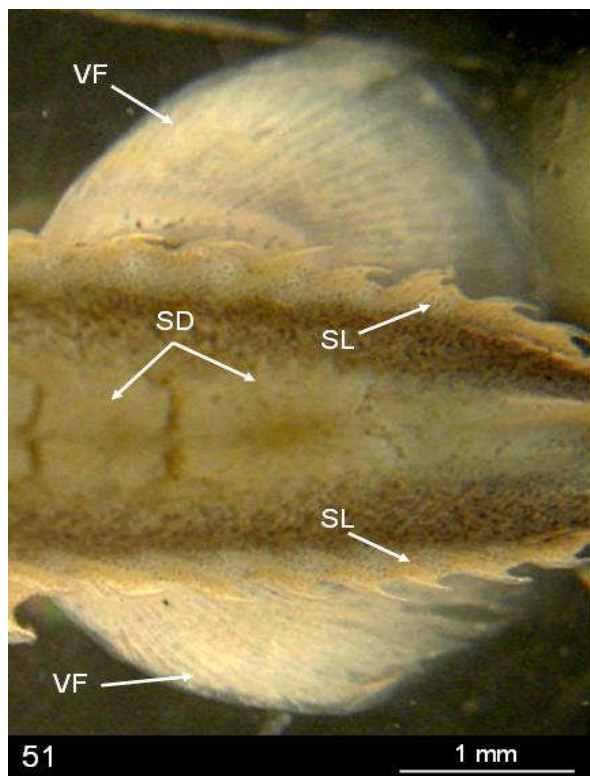


Figura 157. Vista dorsal de las aletas ventrales (VF) de un juvenil en **Estadio 51**, también se han señalado los escudetes dorsales (SD) y los laterales (SL). 40X.

A los 66 dpe la aleta caudal muestra los radios totalmente formados. Además el extremo final de la misma se dobla hacia abajo y la membrana en la parte inferior de la aleta es claramente más ancha que la superior. Además, el pedúnculo caudal va quedando cada vez más libre, ya que la membrana se sigue reabsorbiendo, aumentando la separación entre las aletas dorsal (DF) y caudal (CF) entre las que aparecen uno o más escudetes dorsales, escudetes postdorsales, característico para cada ejemplar. Así como la distancia entre las aletas ventrales (VF) y anal (aF). (Figura 158). La separación entre la aleta anal (aF) y la aleta caudal (CF) también se incrementa. (Figura 159).

Figura 158. Detalle de las aletas dorsal (DF) y anal (aF), donde se aprecian claramente los radios. Además se observa la separación entre las aletas ventrales (VF) y la anal (aF), así como la formación de escudetes entre ellas (SV), al igual que los escudetes postdorsales (SD) entre la aleta dorsal (DF) y la caudal. La línea representa 1 mm.

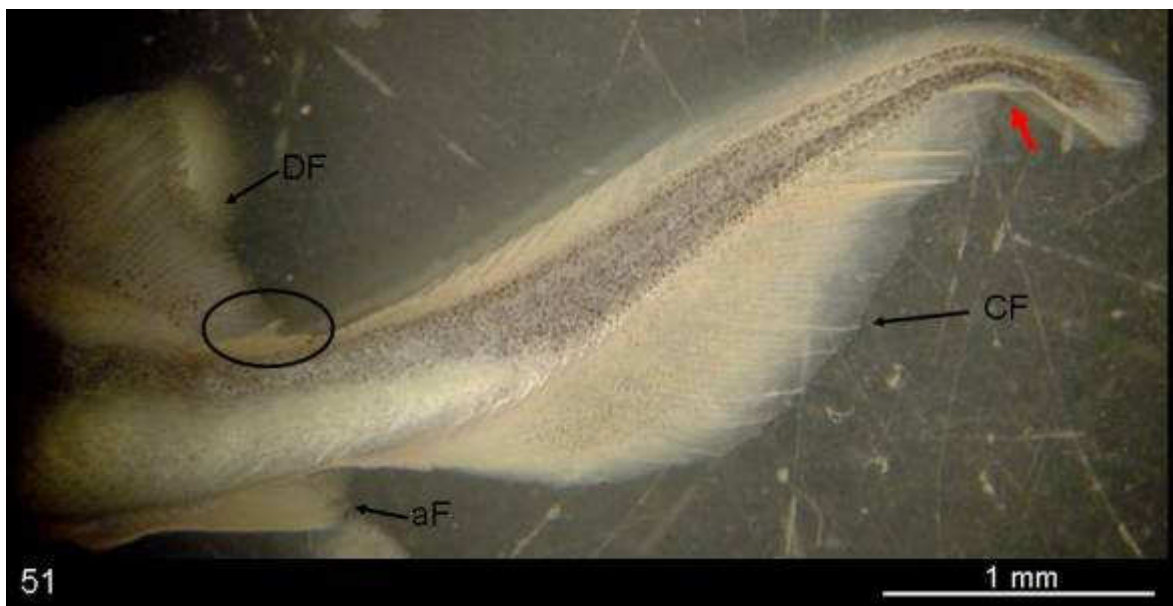
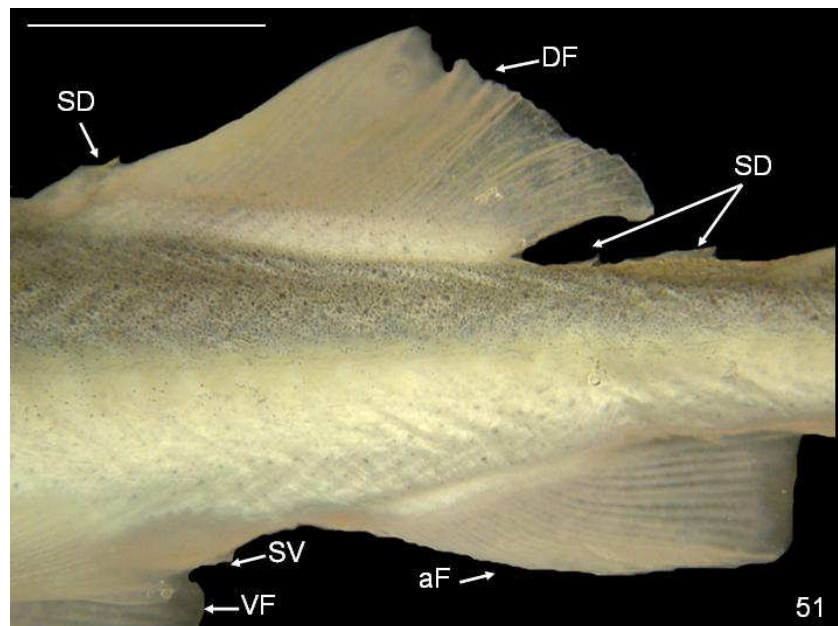


Figura 159. Zona caudal de un juvenil en **Estadio 51** donde se diferencian la aleta dorsal. (DF) separada de la caudal (CF) y sobre el pedúnculo caudal un escudete dorsal (SD) rodeado por una elipse. También se marca con una flecha roja el punto de inflexión del extremo de la caudal y la aleta anal (aF).

Los radios se ven claramente formados (Figuras 160), al final de este estadio la aleta caudal alcanza la forma definitiva, la membrana sobre en la parte superior de la misma es muy pequeña mientras que en la parte inferior es más ancha. La flexión del extremo final de la cola está claramente marcada. (Figura 161).

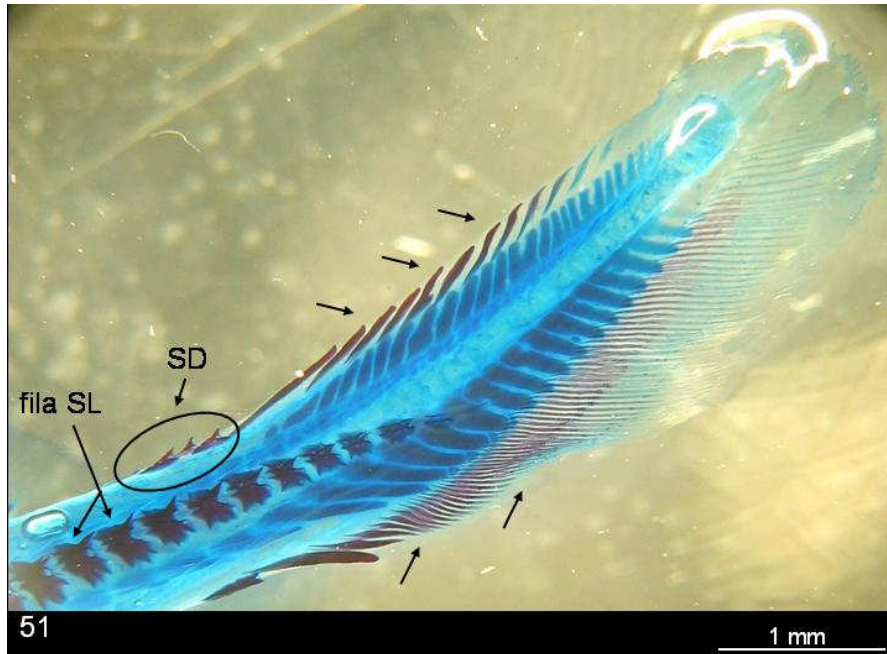


Figura 160. Zona caudal de un juvenil en **Estadio 51** sometido a tinción azul alcian – rojo alizarina, donde se diferencian los radios de la caudal, la fila de escudetes laterales (**SL**) y los escudetes postdorsales (**SD**) por encima del pedúnculo caudal y rodeados por una elipse, entre las aletas dorsal y caudal.

Figura 161. Aleta caudal de un juvenil hacia el final del **Estadio 51**, donde se observa como la parte inferior de la membrana de la aleta caudal es mucho más ancha que la parte superior. La flexión que ha sufrido la porción distal está claramente marcada.

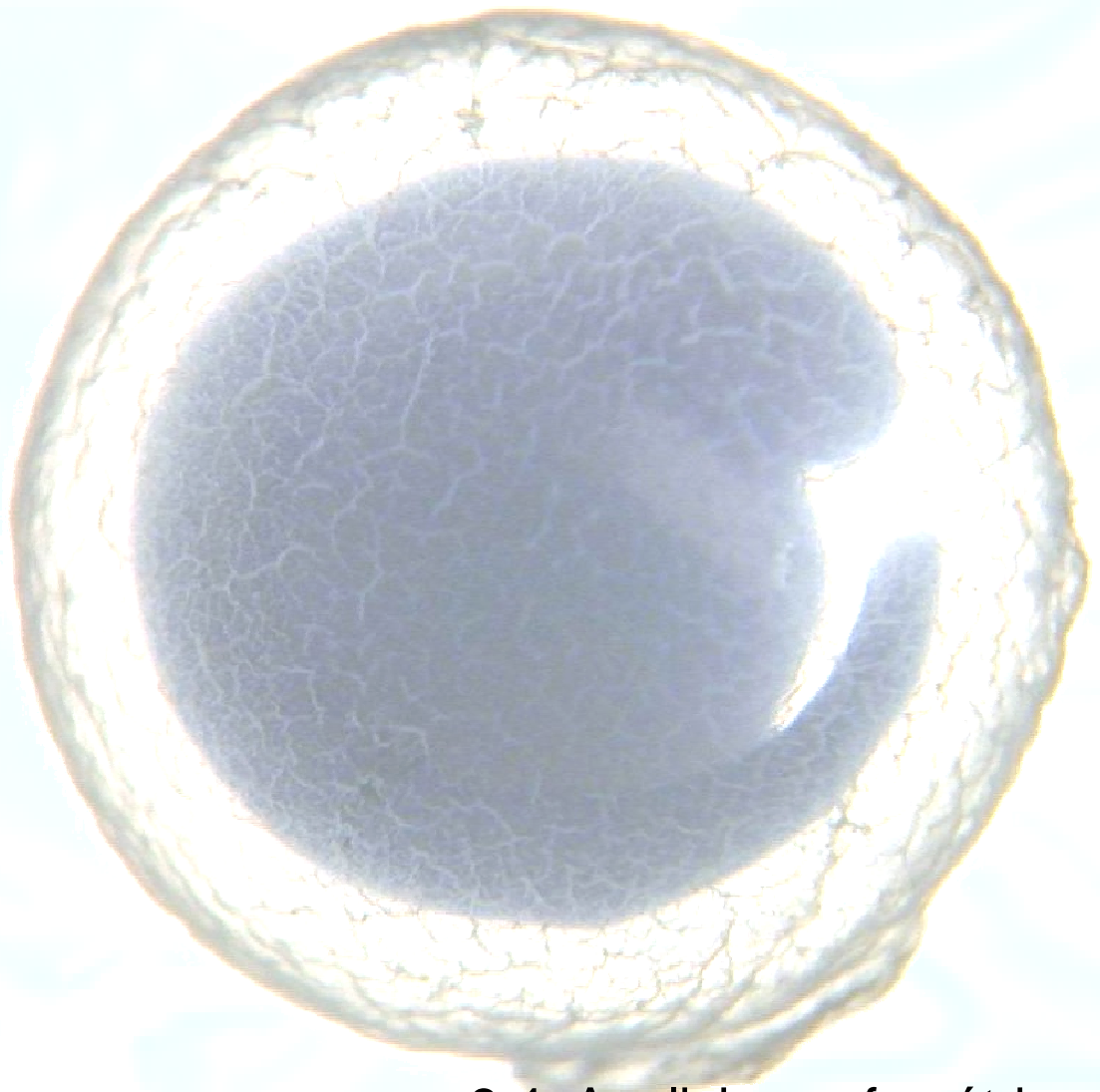


Tabla 8. Propuesta de Estadios en la Etapa Juvenil (Estadios 46 – 51)

Estadios de desarrollo	Tiempo desde la eclosión (15 ± 1° C)	Características específicas del estadio
46	8 dpe	Los escudetes dorsales (SD) aparecen como estructuras independientes de forma triangular de material denso. Aparecen marcadas dos filas blanquecinas a ambos lados, escudetes laterales (SL). Las aletas pectorales presentan forma redondeada y se van separando del cuerpo. Las aletas ventrales superan a la aleta preanal Hendiduras branquiales (totalmente) formadas El morro se va redondeando. Las barbillas centrales tocan el labio superior, las exteriores lo sobrepasan
47	9 – 10 dpe	Los SD alcanzan el borde de la membrana aletil Se observan otras dos franjas marcadas a ambos lados de la válvula espiral, los escudetes ventrales (SV) Las aletas pectorales se van alargando y aparecen más pigmentadas Se ven los radios en las aletas ventrales. El extremo de la aleta caudal se curva Se marca claramente el surco de separación entre las aletas dorsal – caudal y anal – caudal. Comienzan a aparecer los primeros radios en la aleta dorsal y en la parte dorsal de la aleta caudal. Aparecen marcadas las pínulas a ambos lados de la cabeza
48	11 – 13 dpe	Los SD ensanchan su base y comienzan a sobrepasar el borde de la membrana aletil a la vez que ésta se va reabsorbiendo Los extremos de los SD se van curvando más hacia detrás Aparición de un número variable de SD ^{2º} Crece el tamaño y número de pínulas Se aprecian los radios en las aletas pectorales que se separan también del cuerpo. El ano desarrolla a su alrededor una membrana fina. La zona caudal se estiliza
49	14 – 26 dpe	Rápida reabsorción de la membrana aletil, los 1º SD quedan libres El número y tamaño de pínulas varía de unos individuos a otros pero en todos muestran un patrón definido. La pérdida de dientes continúa Las aletas pectorales muestran una forma más hidrodinámica y se encuentran paralelas al cuerpo. Se marcan más las escotaduras entre la aletas dorsal – caudal y anal – caudal están casi totalmente separadas
50	26 – 66 dpe (≈1 – 2 meses)	Aparecen los escudetes laterales (SL) y ventrales (SV) La membrana de los (SD) desaparece completamente Aumentan el número de pínulas y se extienden hacia el morro Se diferencia bien el sistema quimiorreceptor de la línealateral (LL) Los radios se extienden más de la mitad de las aletas Las aletas ventrales pierden la forma lanceolada, se redondea La separación entre aletas dorsal – caudal y anal – caudal se ha producido y se va liberando el pedúnculo caudal Comienzan a aparecer escudetes postanales y pínulas a su alrededor La membrana que rodea a la aleta caudal es más estrecha en su parte superior y se va ensanchando en la parte baja de la inferior. El extremo final de la caudal se dobla hacia abajo.
51	66 - 81 dpe	Los SL y SV se van ensanchando y aplanando adquiriendo forma de placas SD1º totalmente formados pero continúan apareciendo SD2º Patrón de pínulas totalmente formadas. Boca sin dientes Los radios en las aletas llegan casi hasta el borde. La piel las cubre totalmente. La aleta caudal adquiere la forma heterocerca, que mantendrá en el adulto

Tabla 9. Intervalo de muestreo en la Etapa Juvenil. Equivalencia desde el (Estadio 46 - 51), en días post-eclosión (dpe), días post-fecundación (dpf) y horas totales post-eclosión (pe) y post-fecundación (pf) a (T^a 15 ± 1 °C).

Estadios Desarrollo	Muestreo	Días post-eclosión (dpe)	Días post-fecundación (dpf)	Horas totales		Intervalo de muestreo	
				pe	pf		
ESTADIO 46	26/06/02	8 días	15 días	192	360	12 horas	
			15 d + 12 h		372		
ESTADIO 47	27/06/02	9 días	16 días	216	384		
			16 d + 12 h		396		
	28/06/02	10 días	240	408			
ESTADIO 48	29/06/02	11 días	17 días	264	432		
			17 + 12 h		444		
	30/06/02	12 días	18 días	288	456		
			18 d + 12 h		468		
			19 días		480		
01/07/02	13 días	312	492				
ESTADIO 49	02/07/02	14 días	21 días	336	504		24 horas
	03/07/02	15 días	22 días	360	528		
	04/07/02	16 días	23 días	384	552		
	05/07/02	17 días	24 días	408	576		
	06/07/02	18 días	25 días	432	600		
	07/07/02	19 días	26 días	456	624		
	08/07/02	20 días	27 días	480	648		
	14/07/02	26 días	33 días	624	792		
ESTADIO 50	19/07/02	31 días	38 días	744	912	5 días	
	24/07/02	36 días	43 días	864	1032		
	29/07/02	41 días	48 días	984	1152		
	03/08/02	46 días	53 días	1104	1272		
	08/08/02	51 días	58 días	1224	1392		
ESTADIO 51	23/08/02	66 días	73 días	1584	1752	15 días	
	06/09/02	81 días	88 días	1924	2112		



3.4. Analisis morfométrico

3.4 Análisis morfométricos

En este capítulo se han determinado posibles relaciones entre las medidas realizadas sobre diferentes estructuras (aleta caudal, aletas pectorales, saco vitelínico y cabeza) y cómo varía el crecimiento de las mismas con el tiempo y con la longitud.

En primer lugar se ha realizado la comparación de modelos alternativos para ver a cual de ellos se ajustaban mejor los datos. En todos los casos el modelo lineal fue el que dio mejor ajuste y por tanto el elegido. En el anexo se muestran los resultados completos del análisis y en este capítulo sólo los parámetros de los modelos y su bondad de ajuste, necesarios para la interpretación de los resultados.

Aleta caudal

En el caso de la aleta caudal (ver Figura 9, Material y Métodos) se realizaron dos medidas (**a** y **b**), ambas posteriores a la cloaca, donde **a** es una medida oblicua desde el origen hasta el extremo final de la notocorda que va teniendo en cuenta la inclinación y torsión que sufre el extremo final de ésta y **b** es la medida en el plano longitudinal desde el origen hasta el extremo final de la aleta que bordea la notocorda, paralelas al eje horizontal del cuerpo.

Para ambas medidas (en mm) se determina su relación con el tiempo, expresado en horas post-fecundación (hpf), así como con LT (mm) y la relación existente entre **a** y **b**. (Figura 162 y 163).

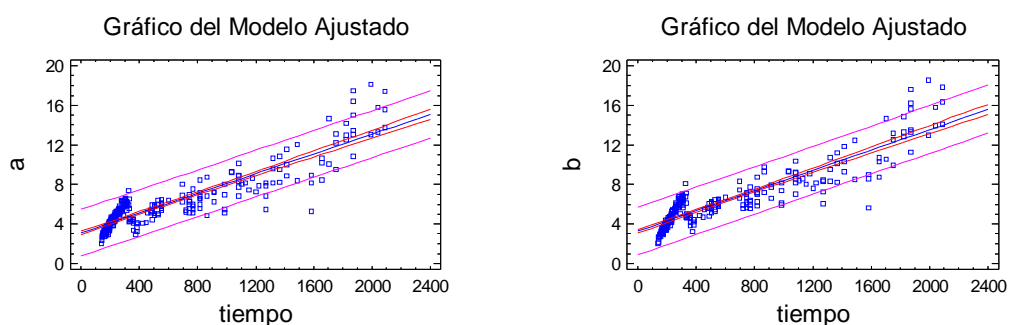


Figura 162. Crecimiento de *a* y *b* de la aleta caudal a lo largo del desarrollo

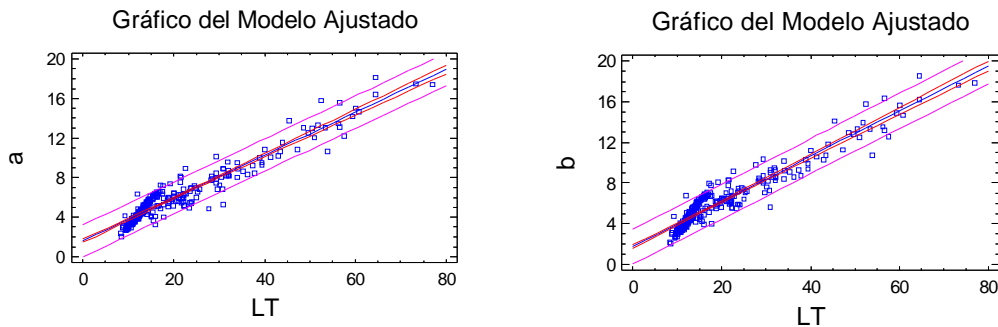


Figura 163. Crecimiento de *a* y *b* de la aleta caudal con la longitud

Se observa, tanto por el coeficiente de determinación como en las gráficas un mejor ajuste del crecimiento con la longitud del cuerpo que con el tiempo.

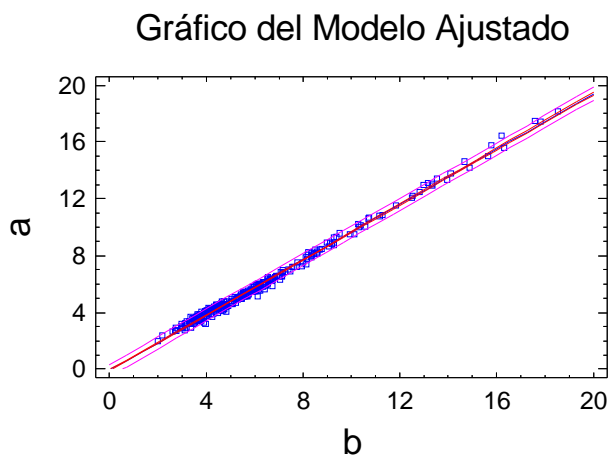


Figura 164. Relación entre las longitudes medidas de la aleta caudal

Se observa un crecimiento isométrico entre ambas longitudes, por lo que cualquiera de ellas podría representar el crecimiento de la aleta caudal indistintamente.

Tabla 10. Relación de las medidas de longitud de la aleta caudal con el tiempo (hpf), con la longitud total LT (mm) y entre ellas

RELACIÓN	R ²	N	a (o.o.)	b (pnte)	p - value
a/ t (hpf)	81.7434	326	3.11285	0.00499	0.0000
b/ t (hpf)	82.1266	326	3.27581	0.00513	0.0000
a/ LT	91.7779	310	1.60950	0.21659	0.0000
b/ LT	91.2028	310	1.74125	0.22211	0.0000
a/b	99.4054	324	-0.07126	0.97318	0.0000

En la Tabla 10, se muestran los parámetros del modelo para las longitudes *a* y *b* medidas en la aleta caudal relacionadas con el tiempo en (hpf) y con la longitud total (LT). Para ambas medidas la relación con la LT presentó un mejor ajuste. De igual modo se muestra la relación entre ambas longitudes *a* y *b* en la que el coeficiente de correlación es 0.99.

Aletas pectorales

En el caso de las aletas pectorales (ver Figura 10, Material y Métodos), también se realizaron dos medida de longitud para cada una de las aletas, se midieron tanto el largo como el ancho y tanto en la aleta derecha como en la izquierda. Las aletas pectorales se miden una vez que los embriones ya han eclosionado y éstas son visibles.

Siguiendo el mismo esquema que para el caso de la aleta caudal, se ha realizado el análisis comparando cada una de las longitudes realizadas sobre cada una de las aletas (derecha e izquierda) tanto con el tiempo (hpf) como con la LT (mm). También se compararon la relación existente entre largo y ancho para cada una de las aletas. Los parámetros del modelo y la bondad del ajuste aparecen en la (Tabla 11) y en las (Figuras 165, 166, 167).

Se puede observar de nuevo un mejor ajuste del crecimiento de estas estructuras con la talla del pez que con el tiempo, diferencias aún más significativa que en el caso de la aleta caudal, posiblemente señal de variaciones individuales del crecimiento en el tiempo muy marcadas, que afectan de manera general a todo el crecimiento en longitud, pero se hacen más marcadas en algunas estructuras, por la asincronía del crecimiento.

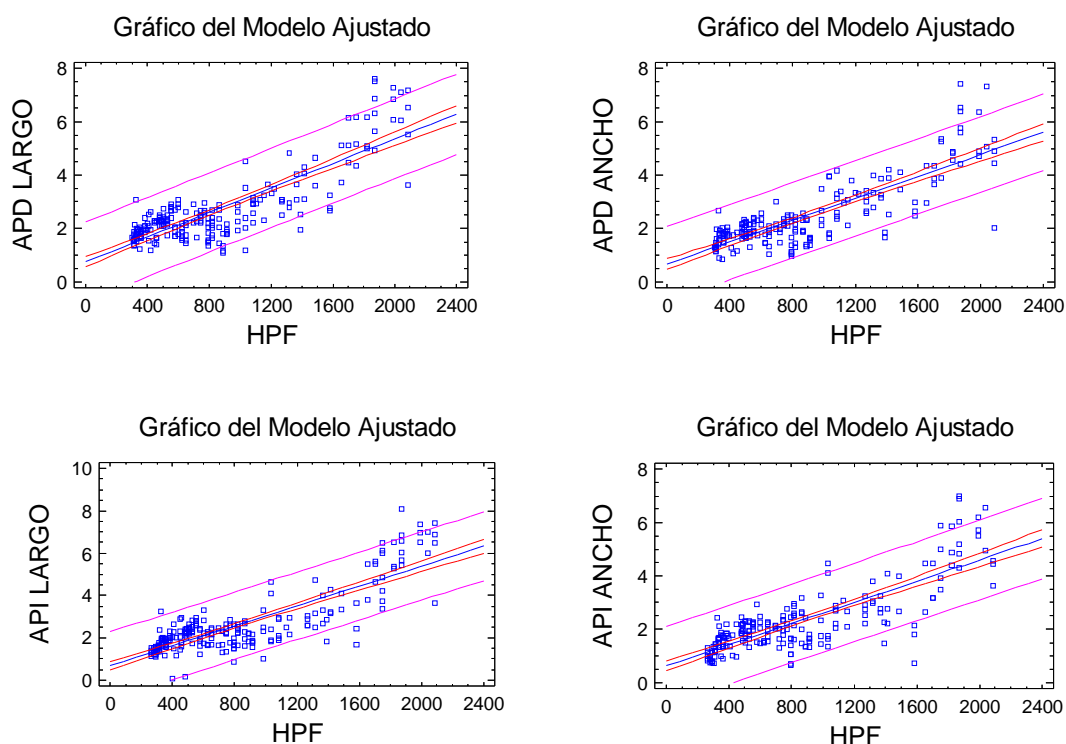


Figura 165. Crecimiento en longitud y anchura para las aletas derecha e izquierda en el desarrollo con el tiempo

Por otro lado también resulta significativo el mejor ajuste que se encuentra en las mediciones realizadas en el lado derecho frente al izquierdo, como puede observarse en la tabla resumen. (Tabla 11).

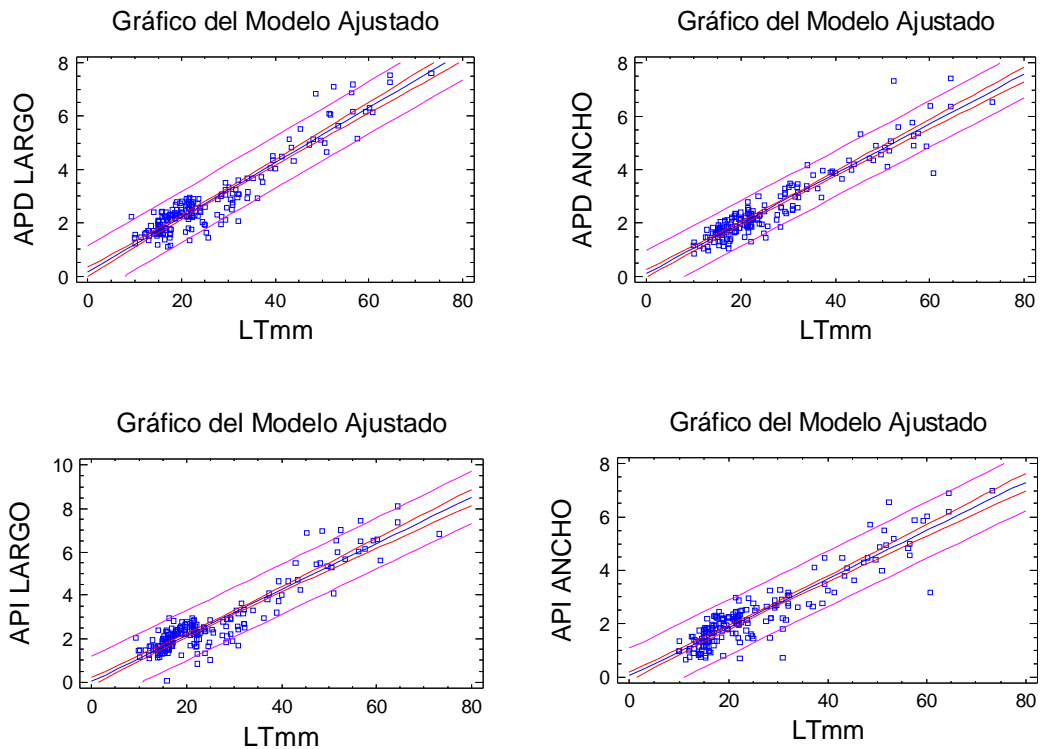


Figura 166. Crecimiento en longitud y anchura para las aletas derecha e izquierda respecto a la longitud total (LT)

Existe también una relación significativa entre el crecimiento en ancho y largo de las aletas, que se ha realizado por separado para las aletas derecha e izquierda dadas las diferencias encontradas en el crecimiento (Figura 167 y Tabla 11).

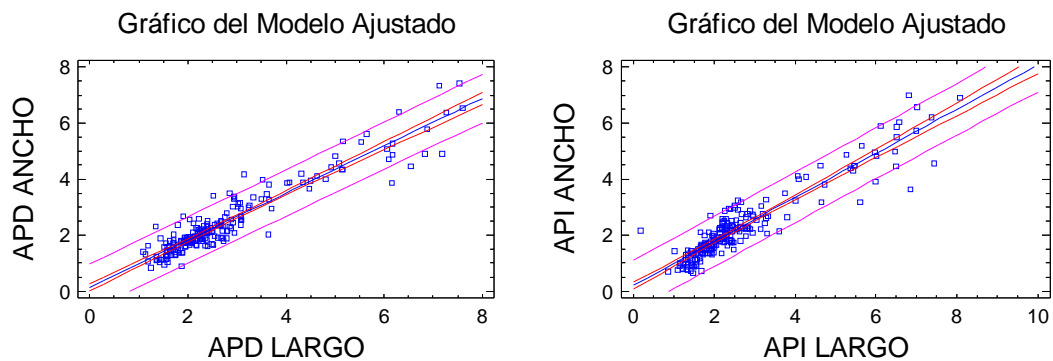


Figura 167. Relación del crecimiento entre ambas longitudes para las diferentes aletas. **APD:** aleta pectoral derecha, **API:** aleta pectoral izquierda.

Tabla 11. Relación del largo y ancho derecho e izquierdo de las aletas pectorales con el tiempo, la longitud y entre ellos.

RELACIÓN	R ²	N	a (o.o.)	b (pnte)	p - value
Largo drcho/ t	69.8848	221	0.75284	0.00230	0.0000
Largo izqdo/ t	69.1498	234	0.67944	0.00235	0.0000
Ancho drcho/ t	68.0729	200	0.65694	0.00206	0.0000
Ancho izqdo/ t	64.9191	209	0.62639	0.00199	0.0000
Largo drcho/ LT	88.4719	178	0.15981	0.10266	0.0000
Largo izqdo/ LT	84.9451	191	0.02814	0.10605	0.0000
Ancho drcho/ LT	89.0213	172	0.11385	0.09330	0.0000
Ancho izqdo/ LT	84.0106	183	0.03791	0.09098	0.0000
Ancho – largo dcho	89.0029	198	0.14424	0.84118	0.0000
Ancho – largo izqdo	87.0601	208	0.06364	0.02106	0.0000

Saco vitelínico

Para determinar el crecimiento del saco vitelínico se midieron tanto el largo como el ancho (mm) y de nuevo se analizaron las relaciones de estas medidas a lo largo del tiempo (hpf) y con la LT (mm), así como la relación existente entre ellas (ver Figura 11, Material y Métodos).

Como puede observarse en la (Figura 168), mientras que el saco vitelínico aumenta su longitud con el desarrollo, su anchura por el contrario, disminuye con el mismo. Ésta misma relación aparece aún más clara en las (Figuras 169 y 170) cuando ambas medidas se comparan con la longitud total de cada ejemplar o entre ellas, lo que apunta a una utilización de las reservas del saco vitelínico a medida que los ejemplares crecen.

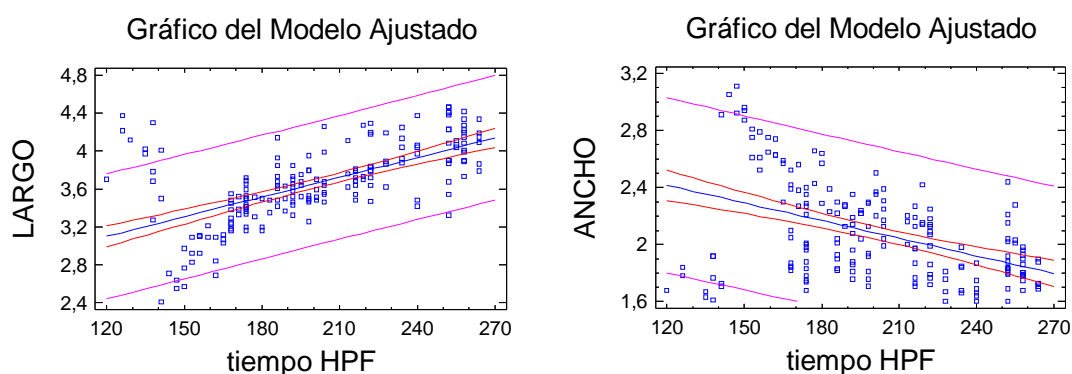


Figura 168. Evolución de la longitud y anchura del saco vitelínico en el desarrollo. HPF: horas post-fecundación.

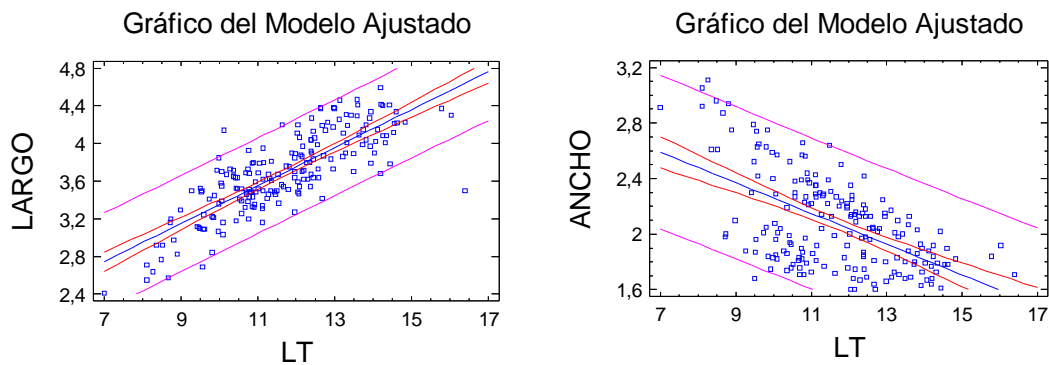


Figura 169. Evolución de la longitud y anchura del saco vitelínico con la longitud total (LT)

Existe también una relación significativa negativa entre el ancho y largo del saco vitelínico. (Figura 170 y Tabla 12).

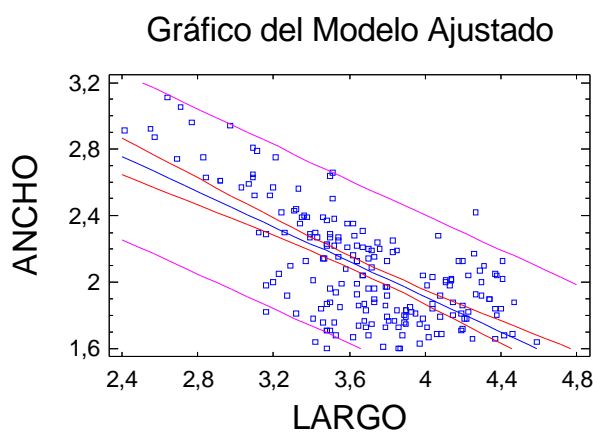


Figura 170. Relación inversa entre la anchura y longitud del saco vitelínico

Las medidas realizadas sobre el saco vitelínico tienen peor ajuste que el resto, (Tabla 12), en parte debido a que éstas se han tomado sobre una superficie ya que el embrión suele estar sobre uno de sus lados derecho o izquierdo, normalmente se toman sobre el izquierdo, sin tener en cuenta que el saco vitelínico se aproxima más a un cilindro y que seguramente si los ejemplares se hubiesen fotografiado desde arriba de manera que el saco vitelínico se hubiese medido en anchura total, es decir, teniendo en cuenta la profundidad de éste el ajuste habría sido mucho mejor.

Tabla 12. Relación del largo y ancho del saco vitelínico a lo largo del tiempo (hpf), con LT (mm), y entre ellas

RELACIÓN	R ²	N	a (o.o.)	b (pnte)	p - value
a/ t (hpf)	38.6111	188	2.27151	0.00691	0.0000
b/ t (hpf)	20.3607	185	2.90875	0.00059	0.0000
a/ LT	64.7677	193	1.33526	0.20159	0.0000
b/ LT	32.3577	190	3.36064	-0.11012	0.0000
a/b	46.1467	193	4.02167	-0.52741	0.0000

Relaciones morfométricas de la región cefálica

Se ha seguido el mismo esquema, primero se ha estudiado la relación de las diferentes medidas cefálicas con el tiempo y después la comparación con la longitud, en este caso relacionado con la longitud de la cabeza (hl) y no con la longitud total. (Para el esquema de las medidas realizadas ver Figura 8 Material y Métodos).

Al igual que con las estructuras analizadas anteriormente los ajustes son mejores con la longitud que con el tiempo. Tal y como podemos ver en la (Tabla 13). En este caso sólo se muestran las gráficas que muestran el crecimiento de las diferentes medidas cefálicas con la longitud de la cabeza. (Figura 171).

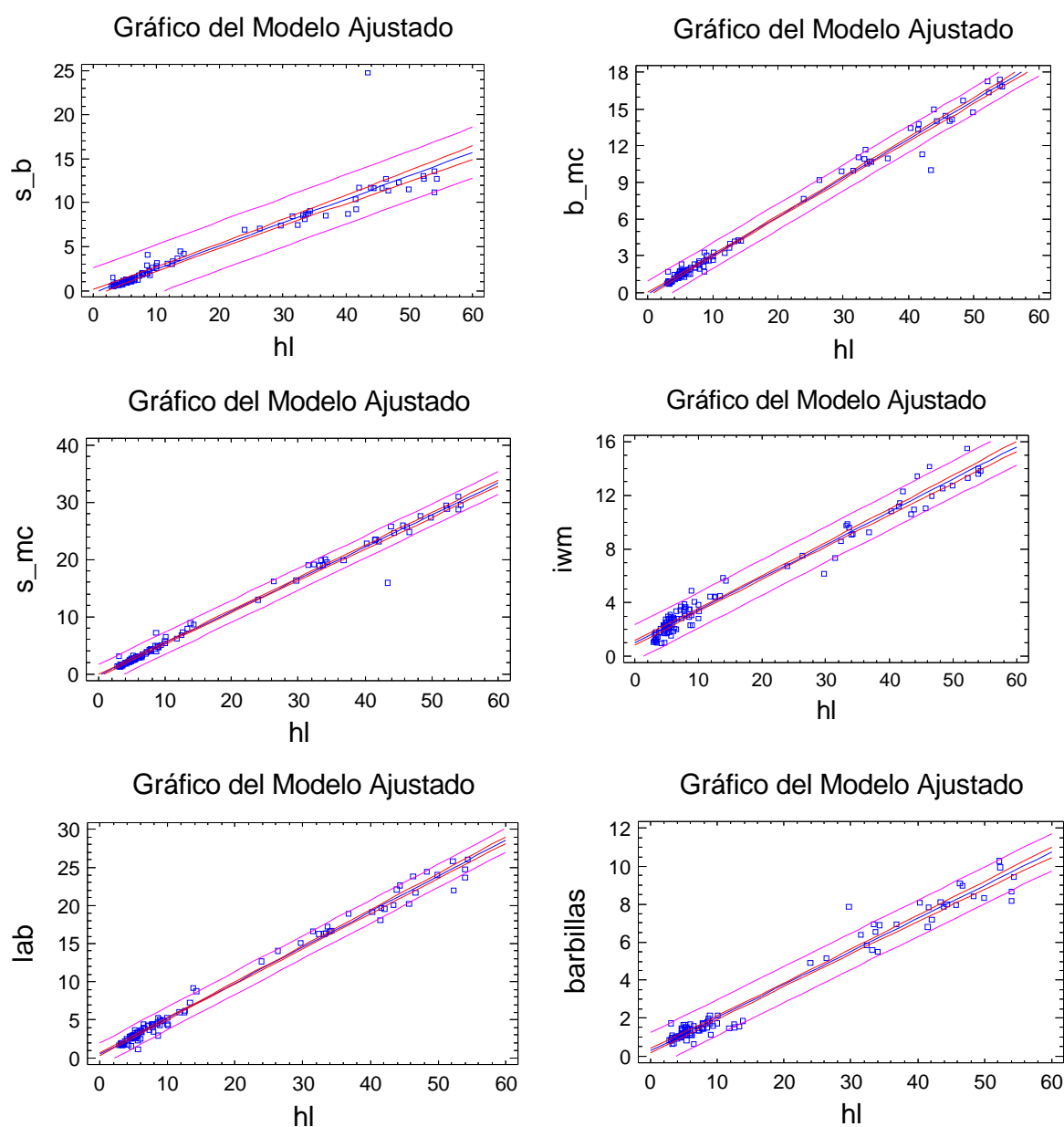
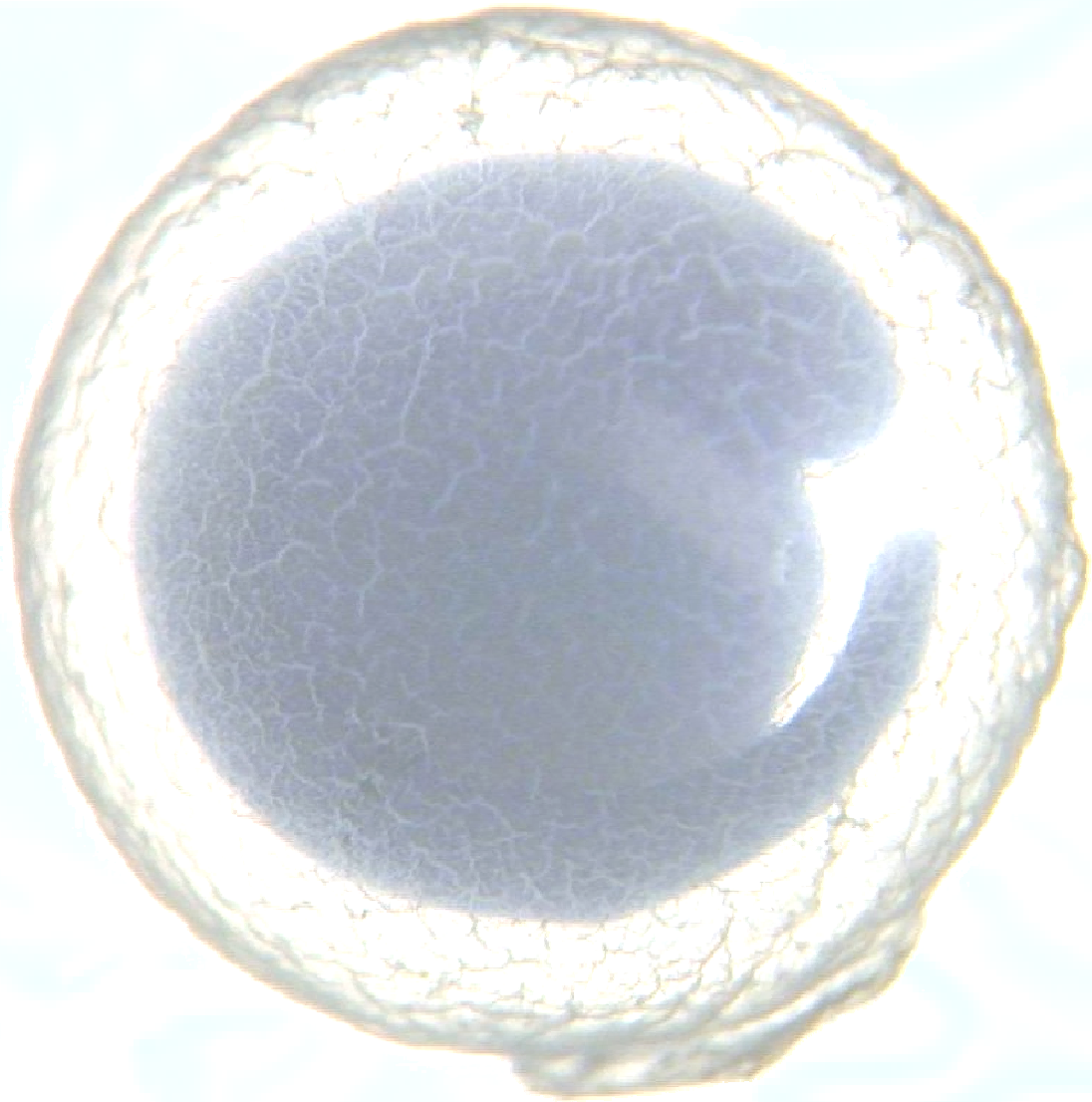


Figura 171. Relación de las diferentes medidas cefálicas con la longitud de la cabeza (hl).

Las medidas lab (anchura del morro medida en la base de las barbillas), junto con s – mc (distancia desde el morro hasta la parte cartilaginosa del labio superior) y b – mc (distancia desde la base de las barbillas hasta la parte cartilaginosa del labio superior) son las que presentan mejor ajustes seguidas de la longitud de las barbillas y de IWM (anchura interna de la boca) y las que presenta peor ajuste de todas ellas aunque es bastante bueno es el s – b (distancia desde la punta del morro hasta la base de las barbillas) posiblemente por la plasticidad de éste en edades tan tempranas. Se manifiesta claramente la asincronía del crecimiento.

Tabla 13. Relación de las diferentes medidas de la región cefálica con el tiempo (hpf) y con la longitud de la cabeza (hl)

RELACIÓN	R ²	N	a (o.o.)	b (pnte)	p - value
s-b/ t	82.0092	114	-1.11501	0.00295	0.0000
b-mc/ t	92.0197	114	-1.27867	0.00356	0.0000
s-mc/ t	93.0020	114	-2.35477	0.00636	0.0000
iwm/ t	91.1847	114	0.09982	0.00277	0.0000
lab/t	92.9619	114	-1.24914	0.00529	0.0000
hl/t	91.8571	112	-3.53853	0.01122	0.0000
barbillas/ t	89.3030	110	-0.34282	0.00196	0.0000
s-b/ hl	90.1866	112	-0.20307	0.26459	0.0000
b-mc/ hl	98.8925	112	-0.10882	0.31569	0.0000
s-mc/ hl	98.8488	112	-0.23815	0.55988	0.0000
iwm/ hl	97.1636	112	1.0053	0.24399	0.0000
lab/hl	98.9904	112	0.50737	0.46708	0.0000
barbillas/hl	97.2206	108	0.28173	0.17418	0.0000



Capítulo 4. Discusión

Los esturiones durante mucho tiempo han llamado la atención de los embriólogos y han despertado el interés por los estudios de biología del desarrollo debido a su estatus de peces "primitivos", y las particularidades obvias de su esqueleto. Los primeros estudios tuvieron un enfoque comparativo y evolutivo: se esperaba que la información sobre el desarrollo embrionario de los esturiones pudiera resolver los problemas de desarrollo en acuicultura. Ryder (1888) emprendió un extenso estudio del desarrollo con la acuicultura potencial del esturión Atlántico, *A. oxyrinchus*, en el río Delaware, y publicó la primera ilustración de esta especie (la mayoría, de embriones de vida libre y adultos). Dean (1895) presentó las descripciones originales del desarrollo temprano del esturión atlántico y de *Lepisosteus*, y los comparó detalladamente.

Los estudios del desarrollo del esturión en EE.UU., resultaron imposibles en las poblaciones naturales, ya que se esquilmaron, e inicialmente los esfuerzos más optimistas en acuicultura no dieron los resultados esperados y se abandonaron. En realidad, hasta 1981 no hubo ninguna información nueva viable (Bolker, 2004). Beer (1981) presentó la primera descripción del desarrollo en el esturión blanco, incluyendo la organización de tablas para el trabajo en acuicultura.

En la investigación moderna, el desarrollo de los estudios de peces acipenséridos incluye generalmente descripciones de los embriones y embriones de vida libre, en gran parte, aunque no exclusivamente, para objetivos de acuicultura (Beer 1981; Conte, 1988; Schmalhausen, 1991; Dettlaff *et al.*, 1993; Van Eenennaam *et al.*, 2001; Deng *et al.*, 2002); fisiología de la reproducción, que es extremadamente importante para el control de la maduración de gametos y puesta (Doroshov *et al.*, 1997); y estudios de crecimiento embrionario y nutrición. La investigación y su aplicación se encuentran estrechamente relacionadas y resulta primordial el trabajo sobre la distribución del tiempo de desarrollo, comenzando con el papel fundamental de Dettlaff (1953), que proporciona las directrices a cuestiones básicas del desarrollo. Una pequeña parte de las investigaciones realizadas sobre embriones fueron para estudiar la filogenia de acipenséridos o por motivos comparativos (Ballard & Needham, 1964; Ballard & Ginsburg, 1980; Poole, 1988; Leug & Wourms 1991; Bemis & Grande, 1992; Bolker, 1993b), o para estudios toxicológicos (Dettlaff *et al.*, 1993; Shagaeva *et al.*, 1993; Akimova & Ruban, 1993, 1996), motivados en gran parte para incrementar el conocimiento de los hábitats naturales de gran parte de las especies de esturión que continuamente se contaminan, y afectan en particular a su alimento, muy vulnerable a los efectos de los agentes ambientales contaminantes. De hecho, las perturbaciones reproductivas debidas a la contaminación, combinadas con la disrupción física o inaccesibilidad a las zonas de puesta por la construcción de presas han llevado a muchas especies europeas de esturiones al borde de la extinción en el hábitat natural.

Los resultados de numerosos trabajos, así como los expuestos en esta tesis, ponen de manifiesto que muchos procesos del desarrollo muestran similitudes en los diversos grupos de vertebrados, independientemente de la posición de dichos grupos en la escala filogenética. Este hecho sugiere que estos procesos se han mantenido sin modificaciones sustanciales a lo largo de la evolución.

Raventós & MacPherson (2001) demostraron que el patrón de los peces del mismo género tiende a ser análogo. El desarrollo temprano en las diferentes especies, y más, entre géneros, es habitualmente, muy parecido. Los embriones de peces espátula y de esturión son casi indistinguibles en la organogénesis temprana, (Bolker, 2004).

El proceso de diferenciación es muy similar para todos los Acipenséridos, y distintos autores han defendido la similitud de los patrones de desarrollo a lo largo de este grupo (Dettlaff *et al.*, 1993; Gisbert *et al.*, 1998), aunque presentan variación del orden temporal. Los huevos de esturión se desarrollan según el patrón holoblástico de crecimiento (Gisbert *et al.*, 1998), como se ha probado para *A. transmontanus* (Beer, 1981; Bolker 1993a; 1993 b), *A. medirostris*, (Wang *et al.*, 1985; 1987) y otros Acipenséridos, (Dettlaff *et al.*, 1993).

Atendiendo a las descripciones realizadas por diferentes autores sobre el desarrollo embrionario y ontogénico de distintas especies de esturión: el esturión del Danubio *Acipenser gueldenstaedti* (Dettlaff *et al.*, 1993), el esturión siberiano *Acipenser baerii* (Gisbert *et al.*, 1998, 1999), el esturión verde *Acipenser medirostris* y el esturión blanco, *Acipenser transmontanus* (Wang *et al.*, 1985, 1987), existen diferencias interespecíficas, presentando variaciones del orden temporal (Gisbert *et al.*, 1998; Boglione *et al.*, 1999).

Los estudios de desarrollo se pueden caracterizar por la suma de las características comunes a todas las especies estudiadas (Dettlaff *et al.* 1993); así, un acontecimiento observado en una especie es aplicable a otras, y se puede generar con ello gran cantidad de información (Schmalhausen, 1991).

A continuación se discutirán los aspectos esenciales del desarrollo de *A. naccarii*, comparándolos con el desarrollo embrionario de otros esturiones haciendo hincapié en las similitudes y diferencias. Se discutirán, en primer lugar los acontecimientos más importantes relativos al desarrollo embrionario hasta la eclosión y en segundo lugar los relacionados con el desarrollo del embrión de vida libre y juvenil que incluye la morfogénesis de las aletas y los escudetes fundamentalmente.

Para *A. naccarii*, se han identificado 35 estadios sucesivos de desarrollo embrionario para unas temperaturas de cultivo determinadas, (15° C y 17° C), destacando las características comunes con otros Acipenséridos en las etapas tempranas del desarrollo, probablemente las más importantes y complejas, dadas las rápidas y numerosas

transformaciones y adaptaciones que tienen lugar (Dettlaff *et al.*, 1993). De hecho, la mortalidad en estas etapas para *A. naccarii* en acuicultura puede superar el 90%.

Hemos dividido el proceso que tiene lugar entre la fecundación y la eclosión en 6 periodos que incluyen la cronología de los diferentes estadios de desarrollo (**Tabla 4, página 74**). I. Segmentación – blastulación (Estadio 1 – 12), desde el momento de la fecundación del huevo y comienzo de la segmentación hasta la formación de la blástula. II. Gastrulación (Estadios 13 – 18), desde el inicio de la gastrulación hasta la gastrulación completa. III. Neurulación (Estadios 18 – 23), desde la neurulación temprana hasta el cierre completo del tubo neural. IV. Final de la neurulación hasta la fusión de las placas laterales (Estadios 23 – 26). V. Desde la fusión de las placas laterales hasta la eclosión del primer individuo (Estadios 26 – 35). V. Eclosión (Estadios 35 y 36), donde el estadio 35 (Te) es la eclosión de los primeros individuos que aparecen en las botellas y el estadio 36 (Tm) es la eclosión en masa.

De los estudios realizados por otros autores se desprende que la duración del desarrollo embrionario es muy variable dependiendo de la especie que se trate, de la cantidad de reservas de vitelo presentes en el embrión y de la temperatura de mantenimiento (Elbal *et al.*, 2000). Por ejemplo, desde la fecundación hasta la eclosión para el salmón éste es de 90 días a 10 °C (Hendry *et al.*, 1998), para la trucha a esta misma temperatura de 40 días (Martinez *et al.*, 2003), para la lubina a 19° C de 2 días (García-Hernández *et al.*, 2001) y para la dorada a 19° C de 3 días (Kamaci *et al.*, 2005).

La temperatura del agua es el factor exógeno más importante que influye en el desarrollo de los peces (Chambers & Leggett, 1987). La temperatura de incubación es inversamente proporcional al tiempo de eclosión. Así las temperaturas más bajas generan periodos de incubación más largos y producen una descendencia de menor calidad (Hardy & Litvak, 2004). La temperatura lleva a la aceleración de los procesos metabólicos del desarrollo.

Los resultados obtenidos con *A. naccarii* nos indican que el desarrollo embrionario está claramente influenciado por la temperatura de incubación tal y como ocurre con otros esturiones (Dettlaff, 1953; Huff, 1975; Wooley & Crateau, 1985; Wang *et al.*, 1985; 1987; Richardson, 1988; Dettlaff *et al.*, 1993; Kynard, 1997; Hardy & Litvak, 2004; Van Eenennaam, 2005).

Las observaciones sobre la puesta natural, documentadas por colecciones de huevos y embriones, indicaron que la mayoría de los esturiones se reproduce dentro del rango de temperatura de los 10 – 20 °C, incluyendo las especies de esturión euroasiático

(Dettlaff *et al.*, 1993) y norteamericano (McCabe & Tracy, 1994; Bruch & Binkowski, 2002; Perrin *et al.*, 2003).

El rango de viabilidad se extiende desde los 8.3 °C para especies del norte tales como el esturión de lago, *A. fulvescens* (Kempinger, 1988) hasta 15 – 20 °C para el esturión del golfo *A. oxyrinchus oxyrinchus* (Chapman & Carr, 1995); dentro del rango de viabilidad para las especies citadas, el desarrollo es más rápido a temperaturas templadas y puede ser considerablemente más lento a bajas temperaturas. Incluso en el esturión blanco se ha observado que el desarrollo puede ser temporalmente suspendido cuando los huevos hacia la mitad de la etapa de blástula tardía, se transportan a temperaturas bajas. El desarrollo normal continúa cuando se aumenta la temperatura (Bolker, 2004).

En algunos procedimientos de cría tradicionales se recomienda para la incubación de los huevos una temperatura por debajo de los 13 – 14 °C, ya que en este caso el desarrollo de hongos es mínimo (Williot, 1989).

Las temperaturas por encima de los 20 °C resultaban muy perjudiciales e incluso mortales para el desarrollo, desde la fertilización hasta la eclosión (Wang *et al.*, 1985, 1987; Chapman & Carr, 1995; Van Eenennman *et al.*, 2005).

Los estudios en el Caspio con beluga (*H. huso*), *A. rudiventris*, *A. gueldenstaedtii* y *A. stellatus*, revelaron efectos generalmente similares de la temperatura sobre las etapas tempranas del desarrollo (Nikols'kaya & Sytina, 1978; Igumnova & Dubinin, 1987; Sytina & Shagaeva, 1987).

Los resultados sobre el límite de tolerancia confirman las adaptaciones conservadoras para la temperatura de puesta en las diferentes especies de Acipenséridos. Sin embargo, los rangos de temperatura óptimas para el desarrollo temprano pueden diferir en las distintas especies, y posiblemente entre los diferentes stocks de una misma especie (Wang *et al.*, 1985). La capacidad de las diferentes especies de esturión para desarrollarse satisfactoriamente y de manera eficiente bajo un amplio rango de temperatura puede proporcionar una ventaja competitiva sobre otras especies estenotérmicas y explicar su persistencia durante toda la evolución, tal y como apuntan (Hardy & Litvak, 2004) para los esturiones de morro corto, *A. brevirostrum*, y esturión atlántico, *A. oxyrinchus*.

Algunos estudios han registrado la temperatura de incubación y la temporalización de las etapas del desarrollo. Estos datos son necesarios para predecir el tiempo de incubación y optimizar el empleo de las instalaciones de cultivo (Dettlaff & Goncharov, 2002). Las observaciones sobre los efectos de las diferentes temperaturas en el desarrollo han conducido al descubrimiento del modelo de desarrollo (Dettlaff & Goncharov, 2002). Dettlaff & Ginsburg, (1960, 1961) propusieron una nueva aproximación al modelo temporal de

desarrollo en animales poiquilotermos, basados en la duración de un ciclo mitótico (τ_0), durante la división sincrónica del huevo dentro de un rango óptimo de temperaturas para cada especie. El factor (τ_0), es como un factor de corrección y es el resultado de dividir el tiempo en minutos que dura un estadio concreto de desarrollo, entre el tiempo que transcurre desde la fecundación hasta que se produce la primera segmentación o tiempo que dura la primera mitosis en el cigoto. Esta razón permite comparar la duración de un mismo estadio de desarrollo en especies diferentes siempre que la temperatura sea la misma (Dettlaff, 1987). Dettlaff (1953), Dettlaff & Ginsburg, (1963) y Dettlaff *et al.*, (1993) desarrollaron esta medida para algunas especies europeas. Estos estudios se pueden utilizar como base para estudiar el desarrollo embrionario de cualquier especie que se desarrolle a cualquier temperatura. Esto ha sido particularmente útil para la distribución y estandarización en la manipulación de los cromosomas (Shelton *et al.*, 1997; Van Eenennaam *et al.*, 1996).

Diferentes embriólogos han desarrollado para los esturiones sistemas de organización o tablas con el fin de facilitar la comparación entre los mismos. Los primeros se deben a Dettlaff & Ginsburg, (Dettlaff & Ginsburg, 1954; Dettlaff *et al.*, 1993) que comprende 45 etapas desde el huevo no fertilizado hasta el embrión de vida libre (prelarva). Aunque al principio estaban basadas en *A. stellatus*, *A. gueldenstaedti*, y *H. huso*, estas descripciones son también aplicables a otras especies de Acipenséridos (Bemis & Grande, 1992; Ballard & Needham, 1964; Bolker, 1993b; Deng *et al.*, 2002). Beer (1981) desarrolló una tabla con menos etapas en el desarrollo para emplearla con el esturión blanco en acuicultura. Mientras que, Bolker (2004) proporcionó una tabla con referencias cruzadas de los esquemas de organización utilizados por (Beer, 1981) y por (Dettlaff *et al.*, 1993).

Principales etapas del desarrollo embrionario de *A. naccarii*

Los huevos de *Acipenser naccarii* presentan, en general, una forma ovoide, aunque algunos pueden ser más alargados o globulares y tienen un tamaño comprendido entre 2.4 – 2.8 mm (Domezain, 2003), siendo éste un tamaño intermedio entre los huevos de esturión, tal y como se muestra en la **(Tabla 3, página 50)**. Son de color grisáceo, aunque pueden presentar diferentes tonalidades, el color de las diferentes regiones varía reflejando la polaridad de su estructura interna (Dettlaff *et al.*, 1993). El tamaño y el color del huevo varían enormemente en los esturiones (Dettlaff *et al.*, 1993) e incluso dentro de la misma especie aparecen variaciones de unas hembras a otras y aún más entre especies. Según (Hardy & Litvak, 2002), es posible que las diferencias de tamaño de las hembras, así como las variaciones estacionales tales como la edad, el peso, y la salud puedan jugar un papel

en el tamaño del huevo, la calidad de vitelo, y los tamaños posteriores de los embriones. El tamaño del huevo también puede desempeñar un papel importante en la supervivencia (Chambers *et al.*, 1989) y puede influir en el tiempo de eclosión y la viabilidad del embrión, pero no tiene ninguna implicación directa para el crecimiento embrionario y la supervivencia del embrión de vida libre. (Gisbert *et al.*, 2000; Gisbert & Williot, 2002).

La adhesividad en los huevos de los esturiones es otra característica considerada específica para las distintas especies y asociada con el comportamiento reproductivo, incluyendo la selección del sustrato para la puesta y las condiciones hidrológicas. En ambientes naturales, la adherencia de la membrana del huevo juega un papel importante, ya que esto permite a los peces dejar en los lugares donde desovan, los huevos, asegurando las condiciones óptimas ambientales para su desarrollo tras la eclosión.

Basándose en los estudios para siete especies de esturiones con diferentes estructuras y adhesividad de las membranas de los huevos (Vorobyeva & Markov, 1999), concluyeron que las especies anádromas que desovaban bajo condiciones variables y generalmente en zonas de baja corriente, presentaban huevos menos adhesivos que aquellas otras especies residentes en aguas con corrientes más fuertes. En otros trabajos se realizan observaciones sobre los huevos de esturión verde, *A. medirostris*, que reflejan la poca adhesividad de los mismos en zonas de puestas de flujo rápido en el río Klamath (Van Eenennaam *et al.*, 2001). Los esturiones verdes, *A. medirostris* salvajes tenían huevos fertilizados con una consistencia adhesiva débil y observaciones histológicas de las membranas de los huevos revelaron que la capa externa del corion era aproximadamente la mitad del grosor que el esturión blanco, *A. transmontanus*. Al parecer los huevos de esturión verde realmente no se fijaban en sustratos abiertos con flujo rápido sino que se encontraban en zonas de grietas del lecho de rocas del río o bajo la gravilla, donde se producía el desarrollo temprano.

La adherencia de los huevos en los esturiones probablemente depende del material segregado cuando se activa, de la estructura molecular específica de la membrana y de la forma con que se fija al sustrato. La velocidad de la reacción, inducida por la envoltura pegajosa, varía según las puestas y puede depender de factores tales como la temperatura del agua, el tiempo del período de desove, la calidad de los huevos o las variaciones entre las hembras.

La rugosidad y textura observadas en la membrana de los huevos de *A. naccarii* parece bastante débil. El estudio de su distribución geográfica pasada y presente (Hernando *et al.*, 1997) en ríos de la vertiente Mediterránea, sometidos a regímenes pluviométricos irregulares y escasos, y la época de desove, fundamentalmente primavera aunque también

se ha descrito actividad otoñal (Domezain, 2003), parecen concordar con una membrana de consistencia débil en comparación con los esturiones citados anteriormente. Además el hecho de que su reproducción tenga lugar en zonas con profundidades entre 2 – 6 m con fondo de grava apoyan esta hipótesis.

En las incubadoras convencionales, la eclosión en masa de los huevos que se adhieren formando aglomerados es prácticamente imposible, debido a la elevada mortalidad de los embriones causada por el abrumador crecimiento del un hongo (*Saprolegnia sp.*) y el agotamiento de oxígeno que se produce dentro de la masa de huevos. Por consiguiente, los huevos fecundados deben ser desagregados usando tratamientos de lécamo convencionales talco (Dettlaff *et al.*, 1993) o caolín como en el caso de *A. naccarii*, para que la eclosión de los huevos ocurra de la mejor forma posible (Williot, 1989).

1. Desarrollo Embrionario

Fertilización

El desarrollo embrionario comienza con la unión de los gametos masculinos y femeninos. El huevo no fertilizado, maduro (Dettlaff & Ginsburg, estadio 1) está ya claramente polarizado, con más vitelo en el polo vegetativo. Los anillos concéntricos con diferente pigmentación (generalmente anillos claros sobre un fondo oscuro) están centrados sobre el polo animal del huevo ligeramente ovoide. La pigmentación puede ser significativamente variable entre hembras de la misma especie, pero generalmente uniforme dentro de la misma puesta, en acuicultura normalmente dentro del mismo baño. Los huevos aparecen con su eje animal-vegetal horizontal. La fecundación se produce por la entrada de un espermatozoide a través de los micropilos presentes en el corion encima del polo animal. Quince o veinte minutos después de ésta el huevo rota 90° de tal forma que el polo animal queda hacia arriba, y conserva esta orientación. Bolker (2004) comprobó que en los huevos de esturión blanco, *A. transmontanus*, recién fertilizados se producen una serie de contracciones corticales rápidas acompañadas por cambios en la pigmentación de los anillos concéntricos del polo animal unos pocos minutos antes de la fertilización. Los cambios en la pigmentación causan la formación de un punto luminoso solo en el polo animal, centrado dentro de un área oscura que está rodeada por una amplia zona de pigmentación reducida. El punto polar claro (LPS) en *A. naccarii* podemos observarlo a los 20' (pf).

El primer acontecimiento sensible después de la rotación es la formación de la luna creciente (LC) o media luna, aunque no es muy visible en huevos ligeramente pigmentados, (Bolker, 2004). En *A. naccarii*, la aparición de la media luna (LC) se observa 1h 20'

postfecundación (pf). La rotación de la capa pigmentada cortical del huevo en relación con el citoplasma más ligero conduce al aspecto de una ligera media luna que se extiende alrededor del huevo. La latitud varía en las diferentes especies, en el esturión blanco, *A. transmontanus* (Bolker, 2004) observó que se extendía desde un tercio a la mitad del camino, aproximadamente 50° encima del ecuador.

La formación de de la media luna indica que se ha producido la rotación cortical. Esta rotación activa del citoplasma que determina el futuro eje dorsoventral en otros grupos de vertebrados, en particular en anfibios, en los que la media luna gris se ha considerado durante mucho tiempo como el primer marcador morfológico del futuro lado dorsal del embrión (Gerhart *et al.*, 1989). Se han realizado muchos trabajos en anfibios para caracterizar la relación entre los mecanismos subyacentes y moleculares con la rotación cortical; sin embargo, se han realizado pocos en esturiones. Puesto que la rotación en sí misma se ha conservado, manteniendo las características ancestrales del desarrollo de los vertebrados, es razonable pensar que muchos de los resultados de los estudios de anfibios probablemente sirvan también para los esturiones.

Segmentación – blastulación (Estadio 1 – 12)

La primera división cruza el polo animal, dividiendo el primer surco el citoplasma del huevo por la mitad (Estadio 4). En *A. naccarii* ocurre en 1h 40' (pf) este normalmente divide la media luna ligera (LPS) formada por la rotación cortical. El segundo surco de división es perpendicular al primero, creando cuatro blastómeros de igual tamaño (Estadio 5), a las 2h 40' (pf). La tercera división, forma 8 células en el polo animal (Estadio 6). Tiene lugar entre las 2h 40' y las 4h (pf) y consiste en la formación de un par de surcos, aproximadamente perpendiculares al segundo surco de división, y localizados a uno u otro lado del primer plano de división. El resultado son dos filas de cuatro células, con el cuarteto central algo más pequeño que los blastómeros periféricos. En este estadio solo el primer plano de división ha rodeado completamente el huevo. Los blastómeros varían en color, reflejando la distribución inicial de pigmentos en el córtex del huevo, a menudo, las células cercanas al polo animal aparecen claramente más oscuras que las células más grandes que lo rodean.

Al final de la división, el citoplasma del polo animal también se subdivide en células pequeñas que se pueden distinguir con un microscopio esteroscópico de bajos aumentos. En este punto (Estadio 11), justo a las 10 h (pf) en el polo animal están los micrómeros uniformemente coloreados, mientras que los macrómeros del polo vegetativo retienen alguna variación en la pigmentación, aunque generalmente son más oscuros que los micrómeros. La zona de transición o células de tamaño intermedio, conocida como zona

marginal rodea al embrión aproximadamente en el ecuador. La localización de la zona marginal es constante dentro de una especie, aunque puede diferir entre especies (Bolker, 2004). Aunque no visible desde el exterior, el fluido que llenará la cavidad del blastocele se ha formado dentro del embrión, que ahora se denomina blástula. El tamaño y localización del blastocele varía algo entre especies, pero se encuentra normalmente localizado en el centro del polo animal, con su porción inferior aproximadamente a nivel de la zona marginal. El blastocele en los embriones de esturión es proporcionalmente menor y de paredes más gruesas que en los embriones de la mayoría de los anfibios, una discrepancia morfológica que tiene diferencias significativas para el mecanismo de la gastrulación (Bolker, 1993c).

Ballard & Ginsburg, (1980) prepararon un mapa de destino del estadio de blástula tardía en esturiones, indicando anticipadamente los destinos de las diferentes áreas del embrión por la marcha de pequeños grupos de células marcadas y el examen en estadios posteriores de la distribución de las células teñidas. Su mapa es muy similar a los realizados para muchos anfibios. La mayoría de las células del polo animal formarán el ectodermo, con la mayoría de la parte dorsal del ectodermo predestinada para formar la placa y el tubo neural. La zona marginal forma principalmente el mesodermo, con células anteriores a la notocorda localizadas cerca del lado medio dorsal, los somitos anteriores originarán mesodermo en dos regiones simétricas laterales a la notocorda y anteriores a la placa lateral y al mesodermo ventral más alejado alrededor del embrión; y las células de la capa del polo vegetativo contribuirán al ectodermo y vitelo, con la capa superficial de células sobre el lado dorsal que forma la cavidad del arquenteron o estómago primario.

Gastrulación (Estadio 13 – 18)

La gastrulación es el proceso por el que la blástula, estructuralmente simple, forma un hueco con el arquenteron interno dando lugar a un eje distinto antero-posterior claramente delineado que se va extendiendo. En *A. naccarii* comprende desde las 20h 10' (pf) (Estadio 13) hasta las 32 h (pf) (Estadio 18) lo que supone una duración aproximada de 32 horas a 17° C, (**Tabla 4, página 78**). Es todo un ensamblaje de procesos dinámicos que van definiendo la morfología del estadio, implicando movimientos activos y cambios de células dentro del embrión. Muchos de los mecanismos que componen la gastrulación se han estudiado detalladamente en la rana *Xenopus laevis*. El trabajo experimental en esturiones indica que mientras muchos de los procesos a nivel celular y mecanismos de la gastrulación pueden ser iguales (y además al parecer conservados desde el ancestro o antepasado común), sus papeles morfogenéticos pueden diferir en función de sus diferentes contextos estructurales y mecánicos (Bolker, 1993c, 1994).

La gastrulación comienza con la formación de una línea corta pigmentada perpendicular a la línea media dorsal a las 20 h 10' (pf), (Estadio 13). Esta línea representa una población de células en la capa superficial de la zona marginal que se adentra en el interior del embrión para comenzar el proceso de involución de células de la superficie. Esta línea aparece en el límite entre las células de la zona marginal y los blastómeros alargados del polo vegetativo. Se forma una estría y la lámina de células de la zona marginal adyacente se va invaginando. En *A. naccarii*, esta línea se forma un poco por encima del ecuador. En realidad en los esturiones existe variación interespecífica. En el esturión blanco, *A. transmontanus*, se ha descrito que la gastrulación comienza en el ecuador de la zona marginal a medio camino entre el polo animal y el vegetativo, y que como en *Xenopus*, este proceso conduce a la extensión activa y convergencia de la zona dorsal marginal. (Bolker 1993c, 2004), mientras que en otras especies el principal indicio de gastrulación es el hundimiento de parte de la superficie, comprendiendo la parte anterior del endodermo y el mesodermo, a través del blastoporo. La epibolia del tejido de la parte superior del polo animal, que ocurre en la gastrulación temprana, desplaza la zona marginal hacia el polo vegetativo de modo que su constricción resulta muy eficaz para que se produzca el hundimiento. Estos movimientos por desplazamientos de la parte superior dan lugar a una constricción ecuatorial del embrión tal y como se ha probado experimentalmente para el esturión blanco (Bolker, 1993c).

En *A. naccarii* a las 21 h 30' se alcanza la gastrulación temprana (Estadio 14) y comienza a formarse el gastrocele. Como el hundimiento continúa, las células, mucho más pequeñas y ligeras del polo animal, cubren la parte oscura, de las células del polo vegetativo. El labio del blastoporo se extiende lateral y ventralmente como si migrase hacia el polo vegetativo, formando un círculo completo alrededor del tapón de vitelo, (Estadio 16), hacia las 25 h (pf). En este punto los movimientos internos de depresión del material hacia el polo animal son, frecuentemente, visibles a través de la superficie dorsal. El blastoporo continúa la constricción del tapón de vitelo (Estadio 16 – 18), entre las 25 h – 32 h, que tarde o temprano se cierra en una pequeña línea cuando los márgenes del blastoporo se dibujan juntos y el tapón de vitelo es un punto apenas perceptible (Estadio 18). Este es el momento de transición entre la gastrulación y la neurulación.

Neurulación (Estadio 18 – 23)

Durante la neurulación (Estadio 18 – 23) se forman los rudimentos del SNC desde la superficie del ectodermo hacia el lado dorsal del embrión que sigue extendiéndose sobre el eje embrionario. Además, se produce la migración de la cresta neural y la diferenciación morfológica temprana de los somitas del mesodermo y del sistema excretor que se hacen visibles junto al tubo neural que se ha formado.

Este periodo en *A. naccarii* tiene una duración relativamente corta para la complejidad de los procesos que tienen lugar en dicha etapa. El tiempo es aproximadamente de 4 horas a 17° C desde el momento de la neurulación temprana (Estadio 19) a las 33 h hasta que el tubo neural se cierra (Estadio 23) a las 37 h.

El principal evento de la neurulación es la elevación de los pliegues neurales desde el lado dorsal del ectodermo (Estadios 19 – 22), entre las 33 y 36 h respectivamente, y la siguiente aproximación y cierre de los pliegues para formar el tubo neural (Estadios 20 – 23), entre las 34 – 37 h respectivamente, el cual después se diferencia en el cerebro y la médula espinal. Los pliegues neurales primero aparecen alrededor del margen anterior de la gruesa placa neural (una región de células ectodérmicas sobre el lado dorsal) y progresa posteriormente paralelo a la línea media. Debido a que la placa neural anterior (la región anterior del cerebro) es la zona más ancha, el cierre de los pliegues a lo largo del tronco se completa generalmente antes que en la región anterior.

Las células de la cresta neural migran desde la superficie dorsal del tubo neural en la neurulación tardía. No hemos realizado un mapa de destino para la cresta neural en *A. naccarii*, pero los datos comparativos y morfológicos sugieren que probablemente da lugar a estructuras similares como en otros vertebrados donde las células de la cresta migran lejos desde la línea media dorsal en masas densas de mesénquima, (Vazquez *et al.*, 2002; Gomez *et al.*, 2008).

Como los pliegues neurales convergen dorsalmente, los rudimentos del sistema excretor llegan a ser visibles como abultamientos a uno y otro lado, que comienzan aproximadamente a nivel del mesencéfalo y se amplian posteriormente. Comienzan a desarrollarse los somitos del mesodermo.

El tiempo relativo del desarrollo del SNC y del mesodermo varía entre especies; en consecuencia, más allá del estadio 24 se hace cada vez más difícil aplicar la designación de las etapas de Dettlaff & Ginsburg, (1954) basada en *A. gueldenstaedti*, *A. stellatus* y *H. huso* a otras especies (Bolker, 2004).

Organogénesis

Aquí están incluidas las Etapas IV. (*Estadio 24 -26*) entre las 38 – 48 h (pf) y V. (*Estadio 26 – 35*), que tienen lugar entre las 48 -105 h.

Como resumen del periodo que comprende desde el Estadio 24 hasta el Estadio 28, ya descritos en detalle, cabe resaltar que se caracteriza porque los procesos de morfogénesis continúan después de que el tubo neural está formado. Durante este tiempo los cambios del embrión hacen que comience a definirse la forma corporal, que aparezcan los rudimentos de los órganos sensoriales (sacos olfativos, ojos, y vesículas auditivas), las partes del cerebro y los rudimentos de las glándulas pituitaria, epífisis y de la eclosión y se separan las regiones troncal y caudal.

El periodo que comprende los Estadios 28 – Estadio 35 se caracteriza por un crecimiento intensivo del embrión, además de que continúa la diferenciación, el corazón comienza a funcionar y la circulación sanguínea a fluir. Los embriones comienzan a responder a algunos estímulos externos (mecánicos y químicos), aunque las contracciones musculares son muy débiles y apenas perceptibles.

Durante este periodo, y hasta la eclosión, los contornos del embrión sufren cambios evidentes. La separación de la cabeza, que había comenzado al final del período precedente, progresa rápidamente. Las etapas sucesivas de este proceso se notaron claramente en los embriones a los que se les retiraron las membranas mientras que estaban vivos. La progresiva profundización del pliegue de la parte ventral anterior del cuerpo, y el crecimiento de las zonas inferiores separan progresivamente la cabeza de la región ventral. Al mismo tiempo, la glándula de eclosión, que antes se localizaba delante del cerebro, se desplaza totalmente a la parte inferior de la cabeza.

En detalle podemos decir que entre la gastrulación y la eclosión, todo el sistema de órganos principales del animal debe ocupar su lugar y además ser funcional. Los estadios tempranos de este proceso son visibles al comienzo de la neurulación tardía (Estadio 22), cuando la reorganización del cerebro primario comienza a aparecer. Como parte del proceso de desarrollo, el eje del cuerpo se define bien y se eleva por encima del perfil de la masa de vitelo endodérmico. Aparecen los rudimentos de los ojos y sacos olfativos, los primeros arcos viscerales, entre las 38 – 43 h (Estadio 24), la cola comienza a separarse del saco vitelínico aproximadamente entre las 44 – 46 h (Estadio 25), aún se reconoce la glándula de la eclosión. Pasados los 2 dpf, sobre las 49 h los somitas son fácilmente visibles. La separación de la parte anterior de la cabeza respecto al saco vitelínico comienza entre las 52 – 66 h (Estadios 28 – 30). Sin embargo, se ha observado que en embriones recién eclosionados de esturión blanco, restos del saco vitelínico siguen conectados por la boca,

(Bolker, 2004). En realidad, la separación delantera nunca es tan extensa como la de la cola. Los embriones eclosionados presentan un saco vitelínico protuberante con una cola larga y activa. Proporcionalmente la cabeza es pequeña y claramente visible sólo con un examen cercano.

El rudimento del corazón aparece como un tubo estrecho justo en la mitad anterior hacia la cabeza a las 49 h a 17° C y entre las 88 – 92 h a 15° C (Estadio 27), se alarga durante el Estadio 29, y comienza a formar una curva en C entre las 54 – 56 h (pf) a 17° C y 96 h a 15° C (Estadio 29). Entre las 70 – 76 h (Estadio 31), el corazón tiene forma de S, y su contracción activa conduce la circulación por los vasos superficiales sobre la superficie dorsal y lateral del saco vitelínico, así como por los vasos principales dentro del cuerpo. Estos resultados ya han sido descritos en detalle para *A. naccarii* Guerrero (2007).

Las evaginaciones de las placodas y el SNC dan lugar a los órganos sensoriales principales, primero aparecen en el Estadio 24, cuando los rudimentos de los ojos y el aumento del tubo neural en la parte anterior es patente. Los sacos olfativos pueden verse a las 54 – 56 h, (Estadio 29), y las vesículas auditivas distinguirse alrededor de las 78 h, (Estadio 32).

La estructura locomotora primaria es la cola, que en embriones y embriones de vida libre, así como en adultos, presenta rigidez axial proporcionada por la notocorda. El pliegue de la aleta, a la que hemos denominado membrana aletil (FF), transcurre a lo largo de los lados dorsal y ventral medio y se extiende sobre el eje del cuerpo proporcionando una superficie que aumenta progresivamente. Las aletas pectorales se desarrollan relativamente tarde siendo apenas visibles en los embriones recién eclosionados, coincidente con otras especies, y probablemente tienen escasa función locomotora hasta que el saco vitelínico se haya reabsorbido en gran parte. De hecho en este momento, los embriones nadan en las piscinas cerca de del fondo y sobre uno de sus lados, debido también en parte al tamaño del saco vitelínico.

Eclosión

La duración del periodo de eclosión plantea considerables dificultades para la acuicultura, de ahí la importancia de conocer cómo se liberan los embriones de sus membranas y las condiciones que favorecen la eclosión simultánea de los mismos. (Dettlaff *et al.*, 1993).

Durante el período de eclosión, los embriones continúan el crecimiento dentro de las membranas hasta el momento en que se liberan de éstas. Por lo tanto, observamos un aumento progresivo del tamaño de los mismos a medida que se retrasa la eclosión. Estos resultados están de acuerdo con los descritos por Dettlaff *et al.* (1993) para otros

Acipenséridos. El período de eclosión comienza cuando encontramos varias docenas de embriones nadando en las botellas de incubación. El número de embriones, por lo general, aumenta rápidamente después, y la eclosión en masa se acelera. Se considera que el período de eclosión acaba cuando ya sólo aparecen embriones deformes, procedentes de huevos con desarrollo anormal, y los embriones muertos permanecen en el fondo de las botellas (Dettlaff *et al.*, 1993).

En esta etapa se engloban el Estadio 35 en el que comienza la eclosión de los primeros embriones de *A. naccarii* en las botellas (Te) que a 17 °C ocurre a las 105 h (pf) mientras que a los 15 °C tarda un poco más y comienza a las 171 h (pf), y el Estadio 36, o eclosión en masa (Tm: mass hatching) aproximadamente unas 15 h después, es decir 120 h (5 dpe) a 17° C y 186 h (7d y 8h pf) a 15° C. (Llorente, 2006; Guerrero, 2007) poniendo de manifiesto como se ha comentado con anterioridad que el aumento de la temperatura lleva a la aceleración de los proceso metabólicos tal y como ya apuntaron (Hardy & Litvak, 2004) aunque cada especie se desarrolla dentro de un rango óptimo (Van Eenennaam *et al.*, 2005), incluyendo las especies de esturión euroasiático (Dettlaff *et al.*, 1993) y norteamericano (McCabe & Trace, 1994; Brunch & Binkowski, 2002; Perrin *et al.*, 2003).

Para *A. naccarii*, en las horas previas al momento de la eclosión, los huevos al igual que en las otras especies de esturiones estudiadas (Conte *et al.*, 1988; Dettlaff *et al.*, 1993; Gisbert *et al.*, 1998; Gisbert & Doroshov, 2003) y diferentes especies de teleósteos de agua dulce (Yamagami, 1973; 1981; 1996; Yasumasu *et al.*, 1989; 1994; 1996; 2004) presentan una distensión y degradación gradual de la membrana más externa, apareciendo algunos ejemplares eclosionados en las botellas, así como, en los propios frascos al tomar la muestra o incluso eclosionan cuando se están observando a la lupa. Las membranas están bastante deterioradas justo antes del momento de la eclosión, en algunas partes de la misma faltan trozos, lo que sugiere la actuación de algunas enzimas que pueden provocar una degradación y disminución en la resistencia de las mismas.

Según Dettlaff (Dettlaff *et al.*, 1993), en las especies cuyos embriones tienen las membranas del huevo más resistentes (*H. huso*, *A. gueldenstaedti*), se produce una cierta disminución en su resistencia de forma gradual durante la embriogénesis, comenzando desde la primera división cuando las membranas son todavía muy resistentes. En otras especies como por ejemplo, *A. stellatus*, la resistencia de la membrana disminuye muy poco, casi de forma insignificante durante el desarrollo. Pero, poco antes de la eclosión, la resistencia de las membranas disminuye bruscamente en las tres especies.

Zotin (1953b) e Ignatieva (1957a) apuntaron que la liberación de los embriones de sus membranas se produce por una enzima secretada por la glándula de eclosión (HG) que

se encuentra en la superficie inferior de la cabeza. Para algunos esturiones se han realizado pruebas de actividad enzimática de la cabeza en etapas sucesivas del desarrollo permitiendo estudiar los cambios en la acumulación de la enzima en dicha glándula y averiguar la etapa de su secreción en el espacio perivitelino (Zotin, 1953b). Se ha determinado que la enzima aparece en la glándula después del inicio del primer latido del corazón, y luego su contenido aumenta rápidamente hasta la etapa que precede a la eclosión (Dettlaff *et al.*, 1993). En esta etapa, la glándula secreta las enzimas en el fluido perivitelino donde la actividad enzimática aumenta rápidamente. La resistencia de las membranas del huevo disminuye rápidamente con la aparición de la enzima en el fluido perivitelino. Estos experimentos demuestran que la disminución en la resistencia de las membranas antes de la eclosión se debe a la influencia de la enzima que se acumula, durante un cierto período de tiempo, en la glándula y, antes de la eclosión, se secreta en el espacio perivitelino.

La secreción de la enzima de eclosión y la actividad muscular, tienen gran importancia en la liberación del embrión de las membranas, aunque también depende bastante de las condiciones ambientales. Se estimulan cuando existe una mejor aireación, por el movimiento del agua y por los impactos a los que los embriones están expuestos (Dettlaff & Ginsburg, 1954; Ignatieva, 1958). Es sumamente significativo que el efecto de los estímulos no cause la eclosión prematura, y que los embriones no surjan del huevo antes del estadio correspondiente al inicio de la eclosión. Claramente, la glándula de eclosión en los embriones de Acipenséridos adquiere la capacidad de expulsar la enzima acumulada sólo en una etapa específica del desarrollo, determinando así la constancia de la etapa de eclosión en el pez. En ausencia de condiciones favorables para la descarga de la enzima, ésta es secretada despacio, la distensión de las membranas se produce parcialmente, de modo que la presión ejercida sobre las membranas por el cuerpo del embrión va disminuyendo. En tales casos, los embriones pueden permanecer dentro de las membranas durante muchas horas. El periodo de eclosión puede prolongarse por otros factores, por ejemplo, la mala calidad de los huevos y las condiciones ambientales desfavorables durante dicho periodo (Dettlaff *et al.*, 1993).

Llorente (2006) concluyó para *A. naccarii*, que las actividades enzimáticas digestivas (α -Amilasa y proteásicas), antes de la eclosión, se relacionan con la ruptura de la cubierta embrionaria, mientras que durante el resto del periodo lecitotrófico, actúan en la digestión de los componentes. De hecho en el momento de la eclosión (Estadio 36) la glándula de la eclosión (HG) se distingue todavía. La actividad de las enzimas de la glándula de la eclosión se ha estudiado en teleósteos de agua dulce (Yamagami, 1973; 1981; 1996; Yasumasu *et al.*, 1989; 1994; 1996; 2004).

Nuestros resultados indican que los embriones de *A. naccarii* al igual que las especies de Acipenséridos estudiadas por Dettlaff (Dettlaff *et al.*, 1993), se liberan de sus membranas en las mismas etapas del desarrollo. Estas etapas son idénticas para huevos de la misma puesta incubados a temperaturas diferentes (Dettlaff & Ginsburg, 1954; Ignatieva, 1979). Además, cercanos al momento de la eclosión, los embriones se mueven activamente dentro de las membranas, que están debilitadas por la acción enzimática, lo que permite que gradualmente consigan romperlas y salir. Moviéndose dentro de las membranas, el embrión mezcla el fluido perivitelino, mejorando así las condiciones de respiración. Si los huevos se incuban en condiciones desfavorables (a una temperatura demasiado alta o demasiado baja o con deficiencia de oxígeno), la movilidad de los embriones se reduce notablemente, (Dettlaff *et al.*, 1993).

Los embriones algunas veces logran la eclosión de inmediato, mientras que otras nadan con las membranas cubriéndoles la cabeza y el saco vitelínico hasta que por fin se liberan totalmente. Cuando rompen la envuelta por la zona de la cabeza, empujan la membrana con la cola saliendo rápidamente. En otros casos, los movimientos más amplios de la región posterior del tronco y la cola permiten que se liberen fácilmente saliendo por la zona de la cola. Esta última es la forma más común en la eclosión. En los casos en que la apertura de la membrana es pequeña, el saco vitelínico se deforma, tomando forma de pera o de ocho, aunque, una vez que el embrión ha eclosionado recupera su forma rápidamente.

La eclosión también puede estar condicionada por el tipo de incubadoras, no siendo algunas de ellos muy favorables (Sadov & Kokhanskaya, 1961; Emel'yanov & Sytina, 1967). En muchos casos, cuando se incuban, los embriones pueden sufrir un retraso muy sustancial en su desarrollo. A veces, incluso los huevos de buena calidad, al incubarse en bandejas pueden sufrir retrasos considerables, haciendo que la eclosión se alargue durante mucho tiempo, hasta 2 - 3 días (Emel'yanov & Sytina, 1967).

La duración del período de eclosión en las diferentes puestas e incluso dentro de la misma puesta a diferentes densidades de incubación puede variar considerablemente (Igumnova, 1979, para *H.huso*).

El tiempo de eclosión de los embriones (DiMichele & Poderes, 1982; DiMichele & Westerman, 1997), el tamaño de los embriones en la eclosión y los caracteres merísticos pueden cambiar según la variación en factores exógenos o debidos al genotipo (Swain & Foote, 1999). De hecho, en condiciones de cría idénticas controladas, el porcentaje de desarrollo embrionario puede variar según los rasgos entre los grupos de diferente origen geográfico (Johnston & McLay, 1999). La variación en el tamaño del huevo entre hembras también puede influir en el tamaño de los embriones, pero en las etapas juveniles del

esturión siberiano (*A. baeri*) estos factores han resultado ser insignificantes mientras las condiciones de cultivo sean estándares (Gisbert *et al.*, 2000). En general, el desarrollo embrionario puede variar según los parámetros ambientales (Kamler, 1992). Además, la interacción entre genotipo y los parámetros ambientales en el criadero, como la disponibilidad de oxígeno (DiMichele & Poderes, 1982) puede influir en el tiempo de eclosión. De la misma manera, el efecto de la temperatura puede variar el porcentaje de desarrollo entre las diferentes variedades genéticas de salmón de compinche *Oncorhynchus keta* (Talman, 1986). Sin embargo, en condiciones óptimas de cultivo, el tiempo de incubación-eclosión se puede utilizar como un indicador cualitativo, así los huevos que tardan más en eclosionar se consideran de menor calidad comparados con el resto (Dettlaff *et al.*, 1993). Se ha puesto de manifiesto en el salmón *Oncorhynchus keta* (Talman, 1986), que en cultivo el efecto de la temperatura puede afectar el porcentaje de desarrollo.

En la **(Tabla 5, página 75)** en la que se compara el desarrollo embrionario de diferentes Acipenséridos a distintas temperaturas podemos observar como para *A. naccarii*, la eclosión se produjo a los 5 días post – fecundación para una temperatura de incubación de $17^{\circ} \text{C} \pm 1^{\circ} \text{C}$ mientras que a $15^{\circ} \text{C} \pm 1^{\circ} \text{C}$ la eclosión en masa tuvo lugar a los 7 días 18 horas. Estos resultados concuerdan con los obtenidos en otras cohortes de la misma especie para otros años (Domezain, 2003).

Podemos decir que, la eclosión de los primeros embriones de *A. gueldenstaedtii colchicus*, según (Dettlaff *et al.*, 1993), (Estadio 35), se produce entre las 104 – 106 h post – fecundación mientras que para *A. naccarii* este estadio tienen lugar sobre las 105 h. *A. gueldenstaedtii* alcanza el Estadio 12 de blastulación tardía a las 12 h 30', con una duración total de 16h 10' que es cuando se inicia la gastrulación mientras que para *A. naccarii* la formación de la blástula tardía se aprecia a las 16 h 10' y el periodo termina a las 20h 10'. El siguiente periodo de gastrulación que comprende los estadios (13 – 18) para *A. gueldenstaedtii* comienza a las 16 h 15' post – fecundación y finaliza cuando se ha producido la gastrulación completa a las 31 h 40' y comienza el periodo de neurulación temprana, Estadio 19 a las 32h 30', mientras que *A. naccarii* completa la gastrulación a las 32 h y la neurulación temprana a las 33 h. El Estadio 23, cuando se produce el cierre del tubo neural, tiene lugar a las 37 h 30' para *A. gueldenstaedtii* mientras que para *A. naccarii* se produce a las 37 h. El final de la neurulación y la fusión de las placas laterales (Estadios 23 – 26) en *A. gueldenstaedtii* finaliza a las 50 h (Estadio 26) mientras que para *A. naccarii* lo hace aproximadamente a las 48 h (2dpf). La fusión de las placas laterales hacia el inicio de la eclosión de algunos embriones (Estadio 26 – 35) oscila entre las 53.20 h., (Estadio 27) y las 104 – 106 del Estadio 35 mientras que en *A. naccarii* lo hace entre las 49 h, (Estadio 27) y las 105 del Estadio 35 (Te). Sin embargo, la temperatura de incubación para *A. naccarii* es

de 1° C menos que para *A. gueldenstaedti*. Por tanto, los diferentes estadios de desarrollo se alcanzan antes en *A. naccarii*, es decir, su desarrollo es más rápido que el de su especie más cercana filogenéticamente (Robles *et al.*, 2004) como es el esturión ruso, *A. gueldenstaedtii* (Dettlaff *et al.*, 1993), incluso a temperaturas más bajas.

Cuando se compara el desarrollo embrionario de *A. naccarii* a 15 °C con otros esturiones, no tan cercanos filogenéticamente, como *A. medirostris* y *A. transmontanus*, para una temperatura cercana a los 16° C (15.7° C) se observa que la eclosión en masa de todos ellos está en torno a los 7 dpf, teniendo en cuenta que la temperatura de incubación de *A. naccarii* es menor que para los otros dos esturiones, podemos afirmar nuevamente que su desarrollo embrionario es más rápido.

Según (Wang *et al.*, 1985; 1987), la eclosión más rápida del esturión verde respecto al esturión blanco, *A. transmontanus*, podría asociarse con la membrana más delgada y frágil del esturión verde, *A. medirostris*, asociado a una estrategia reproductiva de especies que comparten el mismo habitat. También esta estrategia se ha puesto de manifiesto entre dos especies de ciprínidos en un río de régimen mediterráneo en el sur de la Península Ibérica (Soriguer, 1996; Soriguer *et al.*, 2000).

Aunque sólo sea una nota de carácter especulativo y teniendo en cuenta lo anteriormente expuesto, podemos decir que aunque *A. naccarii* es una especie con distribución histórica en el sur de Europa, su membrana presenta unas características muy similares a la del esturión verde, *A. medirostris*, delgada y frágil. Esto pudo formar parte de una estrategia reproductiva de una especie que compartió hábitat con otra, tal y como ha sido el caso de *A. naccarii* con *A. sturio*.

2. Embrión de vida libre y juvenil

Durante las etapas tempranas de desarrollo embrionario los procesos de morfogénesis y diferenciación son muy intensos aunque en la eclosión, los distintos sistemas de los peces todavía no han adquirido su completa funcionalidad. Por consiguiente, los cambios morfométricos cuantitativos importantes ocurren y son responsables de una transformación progresiva de los especímenes recién eclosionados, desde la forma del cuerpo del embrión a una forma juvenil o adulta en un periodo relativamente corto, lo que sugiere que el crecimiento funcionalmente optimizado para la supervivencia sea un rasgo común entre los embriones de vida libre de los peces teleósteos (Osse *et al.*, 1997).

El desarrollo de todas las especies de Acipenséridos estudiadas por Dettlaff *et al.*, (1993) (*H. huso*, *A. gueldenstaedti*, *A. stellatus*, *A. ruthenus* y *P. kaufmanni*); Wang *et al.*,

(1985; 1987) (*A. transmontanus*, *A. medirostris*), es muy similar. Por consiguiente, los rasgos comunes para todas estas especies pueden usarse para describir etapas individuales de los embriones de vida libre (Dettlaff *et al.*, 1993). Luego, estamos seguros de que las descripciones sobre estas etapas presentadas para *A. naccarii* pueden también utilizarse para la comparación con otras especies.

En los esturiones, las diferencias entre los embriones de vida libre de las distintas especies al inicio de la eclosión (Estadio 36), son relativamente moderadas (Alyavdina, 1951b; Dragomirov, 1953a; 1961b); siendo difícil discernir entre especies, puede ayudar a esta tarea considerar el tamaño, pigmentación de los embriones y tamaño del saco vitelínico (Dettlaff *et al.*, 1993). Estas diferencias se hacen más patentes en la etapa de transición a la alimentación activa, por lo que al comienzo del Estadio 45, los embriones de muchas especies se pueden identificar sin demasiada dificultad (Dettlaff *et al.*, 1993). Además, debemos recordar que hasta los embriones de vida libre obtenidos de los huevos de una sola hembra muestran una cierta heterogeneidad en la duración de las etapas en individuos diferentes. Esta dispersión puede ser deberse a las diferencias de las propiedades iniciales de los huevos o las condiciones de cría. Además, en las diferentes puestas este efecto de dispersión podría ser diferente (Dettlaff *et al.*, 1993). Cuanto más controladas y estandarizadas se encuentren las condiciones de cultivo más insignificantes serán estas diferencias.

Para *A. naccarii* las diferencias fundamentalmente con otros Acipenseridos se producen a nivel interno, por ejemplo, el corazón comienza a latir en diferentes etapas (Icardo *et al.*, 2004; Guerrero, 2007); formación del digestivo (Llorente, 2006); el desarrollo y caracterización de los receptores sensoriales (Camacho, 2008); cerebro (Gomez, 2008). Podemos afirmar sin embargo, que respecto al desarrollo de la morfología externa, existen grandes semejanzas entre los embriones de Acipenseridos en cuanto a la formación de estructuras por estadios, no así por días. Aunque creemos que los cambios interespecíficos a nivel morfológico externo son más patentes en la etapa juvenil. A medida que avanzamos en las diferentes etapas (desarrollo embrionario, embrión de vida libre, juvenil), como ya hemos comentado en ocasiones anteriores, la duración de cada estadio es mayor y aún se observa este hecho mejor en la etapa juvenil donde los dos últimos estadios que proponemos pueden llegar a durar algo más de un mes. Es evidente que conforme los ejemplares crecen los procesos morfológicos se van ralentizando y por tanto, es lógico que los estadios ocupen más tiempo. Lo esencial es que las características de ese estadio son propias del mismo y que cuando esas características cambian estamos hablando de otro estadio. Por eso, la propuesta que hacemos de Estadios en la Etapa Juvenil cobra significado y está totalmente justificada. Es decir, en la etapa juvenil sugerimos 6 estadios

(Estadios 46 – 51) para *A. naccarii*, donde se definen determinadas estructuras que en unos casos al final del Estadio 51 serán ya prácticamente definitivas y se mantendrán en el adulto, por ejemplo las diferentes aletas y otras que todavía podrían sufrir algún cambio más. Es por este motivo, por el que en ningún momento descartamos que estos 6 estadios propuestos puedan acabar siendo alguno más, ya que nuestro estudio abarca desde la fecundación hasta 3 meses pf y nos hemos percatado de que algunas estructuras no acabarán siendo las definitivas hasta unos meses después, como es el caso de los escudetes dorsales.

Creemos que las descripciones de estas etapas de desarrollo, embrión de vida libre y juvenil para *A. naccarii*, nos permite comparar diferentes puestas en distintas condiciones de cría. Al mismo tiempo, esto nos sirve para estimar la calidad necesaria de la puesta y determinar lo más conveniente para el cultivo y la cría. Tales descripciones son también necesarias para estudios experimentales. A través de ellos es posible comparar el desarrollo de los embriones de vida libre y juveniles con otras especies de Acipenséridos y para diferentes temperaturas ya que para cada estadio se describen la aparición o formación de estructuras completas.

En este apartado de discusión realizamos una síntesis del momento de aparición y forma de las estructuras externas más importantes a nivel de guía, de manera que pueda utilizarse para identificar con facilidad el Estadio en el que se encuentran el embrión de *A. naccarii* una vez que ha eclosionado. También estamos seguros de que las tablas que se aportan como resumen al final de cada subcapítulo de los resultados (etapa de desarrollo embrionario, embrión de vida libre y juvenil), donde se recoge lo más significativo a nivel externo y aportaciones a nivel interno recogida por otros autores para esta especie, resultarán de gran utilidad para solventar los problemas que pudiesen surgir en su cultivo y por supuesto para la comparación con otros Acipenséridos.

Para *A. naccarii* es la primera vez que se realiza un estudio de desarrollo ontogénico a nivel morfológico y la primera en la que se plantean y proponen nuevos estadios para la etapa juvenil.

El desarrollo de las diferentes aletas y escudetes es uno de los cambios más importantes que se producen. Debemos tener en cuenta que aunque aquí las discutamos por separado su origen es común, es decir, a partir de un único pliegue principal que ya podíamos observar en el Estadio 30, antes de la eclosión, que se extiende desde detrás de la cabeza, recorre toda la parte dorsal, rodea la cola y acaba justo detrás de donde finaliza el saco vitelínico, al que habíamos denominado membrana aletil (FF). Las aletas pectorales son las únicas que no se forman a partir del pliegue FF, aunque según la teoría del pliegue

de la aleta para explicar el origen de las aletas pares, se decía que éstas eran fundamentalmente semejantes a las aletas impares en su estructura y que podía haberse originado de la misma forma. En ambos casos la aleta posee estructuras esqueléticas centrales, y una capa de músculo a cada lado. (Romer & Parson, 1981)

Vamos a diferenciar entre aletas pares (pectorales y pelviana), aletas impares en la línea media dorsal, caudal, anal y finalmente escudetes (SD, SL, SV, SD1°, SD2°, SD postdorsales, SV postanales). Las aletas pares pueden haber sido inicialmente estructuras estabilizadoras que se proyectaban lateralmente; más tarde se transformaron en órganos direccionales flexibles, y son pocas las formas en las cuales poseen un papel en la propulsión. Las aletas impares son órganos de estabilización en la línea media.

Aletas pares: aletas pectorales y pelvianas

Aletas pectorales

Las aletas pectorales son las únicas aletas que no se desarrollan a partir de la membrana aletil inicial, se encuentran a ambos lados del cuerpo, aparecen hacia la mitad del saco vitelínico en su parte superior. En el momento de la eclosión son casi imperceptibles a simple vista pero ya aparece un pequeño abultamiento sobre el saco vitelínico que es el primer indicio de formación de estas aletas. Pero no es hasta el siguiente estadio, Estadio 37 (1 dpe; 17° C) y (1 – 2 dpe; 15° C) cuando se pueden distinguir los rudimentos de las aletas pectorales como pequeños pliegues de la epidermis. En *A. baeri* se ha descrito que los rudimentos de las aletas pectorales aparecen entre (1 – 2 dpe, 13 – 14° C) como pequeños pliegues (Gisbert, 1999), también aparecen 1 dpe (para un rango de temperatura de 16° a 20° C) en el esturión blanco, *A. transmontanus*, (Beer, 1981). En el Estadio 39 (2 dpe; 17° C; 3 dpe; 15° C), las aletas han aumentado de tamaño y su base casi alcanza la superficie lateral del estómago, además comienzan a observarse los primordios musculares, Estadio 40 (2 – 3 dpe, 17° C; 3 – 4 dpe, 15° C). Más tarde las aletas se desplazan, adquiriendo una forma oblicua al cuerpo en el Estadio 41 (3 dpe, 17° C; 4 dpe, 15° C) y descendiendo a la zona media moviéndose hacia delante en el Estadio 42 (3 – 4 dpe, 17° C; 5 – 6 dpe, 15° C). En el Estadio 44 (4 – 5 dpe, 17° C; 6 – 7 dpe, 15° C) presentan una forma más redondeada y son más grandes para acabar al final de la etapa de embrión de vida libre en el Estadio 45 (5 dpe, 17° C; 7 dpe, 15° C) desplazándose hacia el lado ventral pasando de una posición más o menos perpendicular al cuerpo a otra más paralela a éste. Al inicio de la etapa juvenil, Estadio 46 (8 dpe; 15° C), las aletas presentan mayor tamaño y están más pigmentadas en su base, donde aparecen los primordios musculares. Esta zona pigmentada se extiende más en el siguiente estadio, Estadio 47 (9 – 10 dpe),

además se alargan y van perdiendo la forma redondeada. Los radios de las aletas aparecen sobre los primordios musculares en el Estadio 48 (11 – 13 dpe, 15° C). En *A. baerii*, Gisbert, (1999) describió que a los (7 dpe, 13 – 14 ° C) aparecen los rudimentos de los radios de las aletas pectorales (de 7 – 9). En *A. transmontanus* (Beer, 1981) también los radios de las aletas pectorales son visibles en la base de las aletas a los 7dpe y a los 13 dpe las aletas ventrales han migrado hacia la región ventral del tronco (para rango de temperatura de 16° a 20° C)

El aspecto de las aletas en el Estadio 49 (14 – 26 dpe) es el de unas estructuras más hidrodinámicas paralelas al cuerpo. La forma de las aletas no varía pero presentan un aspecto más robusto, los radios se extienden más de la mitad de las aletas en el Estadio 50 (26 -66 dpe, de 1 – 2 meses) y llegan casi hasta el borde en el Estadio 51 (66 – 96 dpe). Ahora la piel pigmentada las cubre totalmente. Consideramos que al final de este estadio las aletas pectorales están totalmente formadas.

Aletas pelvianas o ventrales

Los rudimentos de las aletas pelvianas no aparecen hasta el Estadio 40 (2 – 3 dpe, 17° C; 3 – 4 dpe, 15° C) y lo hacen como pliegues longitudinales y estrechos sobre el pliegue preanal hecho que prácticamente coincide con *A. baerii* (Gisbert, 1999), donde los rudimentos de las aletas pelvianas aparecen a los 4 dpe, (13 -14° C), pudiendo diferenciarse como pliegues estrechos de la epidermis. A continuación, Estadio 41 (3 dpe, 17° C; 4 dpe, 15 ° C), el pliegue de la aleta preanal comienza a estrecharse y el extremo final de las aletas ventrales se ensancha. En *A. transmontanus* se ha descrito que el pliegue de la aleta es evidente a los 4 dpe y son prominentes a los 5dpe (Beer, 1981). En el Estadio 42 (3 – 4 dpe, 17° C; 5 – 6 dpe, 15° C), el pliegue de la aleta preanal sigue estrechándose y las aletas ventrales presentan una forma algo más alargada, mientras que el siguiente estadio, Estadio 43 (4 dpe, 17° C; 6 dpe, 15° C) las aletas ventrales alcanzan el borde de la aleta preanal (membrana aletil - ventral) que se ha reducido bastante en su parte posterior. En el Estadio 44 (4 – 5 dpe, 17° C; 6 – 7 dpe; 15° C) los lóbulos de las aletas ventrales sobrepasan ya el pliegue preanal. Al inicio de la etapa juveni, Estadio 46 (8 dpe, 15° C), las aletas ventrales superan el pliegue de la aleta preanal mientras que en los dos días siguientes, Estadio 47 (9 – 10 dpe, 15° C) ya se observan los radios en las aletas, sin embargo, para *A. baerii* los rudimentos de los radios anales (de 9 – 10) aparecen antes, a los (7 dpe, 13 – 14° C). En *A. transmontanus* los radios de las aletas pelvianas se extienden a los 10 dpe (Wang *et al.*, 1985). En *A. naccarii*, estas aletas prácticamente no sufren cambios hasta el Estadio 50 (26 -66 dpe, 15° C), en el que pierden la forma lanceolada y sus extremos aparecen más redondeados. En el Estadio 51 (66 – 96 dpe) los radios de las aletas ya llegan cerca del

borde distal y la piel los cubre totalmente. Puede decirse que han alcanzado su forma definitiva.

Aletas impares: dorsal, anal y caudal

Comentaremos el desarrollo de las aletas impares en conjunto puesto que a partir de la cola que en el momento de la eclosión es proterocerca se van a ir formando y diferenciando estas tres aletas. Cuando acaban de diferenciarse la cola es heterocerca, es decir uno de sus lóbulos se encuentra más desarrollado que el otro, en este caso el lóbulo superior.

El primer cambio que se produce en la membrana de la zona de la cola es un pequeño abultamiento en la parte dorsal de la misma que corresponde al lugar de formación de la futura aleta dorsal.

En el momento de la eclosión (Estadio 36) observamos una cola proterocerca. En *A. transmontanus* (Beer, 1981) describió que 1 dpe (para rango de T^a de 16° - 20° C) la membrana aletil (FF) es ancha, especialmente en la región caudal. En el Estadio 38 (a los 2 – 3 dpe, 15° C) aparecen los primeros indicios de formación de las aletas dorsal y anal, como zonas algo más pigmentadas en las que se pueden diferenciar los rudimentos de los primordios musculares. También se ha descrito para *A. transmontanus*, que a los 2 dpe el lugar de la futura aleta dorsal aparece más pigmentado, los melanóforos, aunque dispersos por todo el cuerpo, se concentran desde la región de la futura aleta dorsal hacia el pedúnculo caudal. En el Estadio 39 (2 dpe, 17° C; 3 dpe, 15° C) ya se observa como la membrana aletil comienza a elevarse en la zona dorsal. Esta pequeña elevación constituye el inicio de la formación de la aleta dorsal. La aleta caudal comienza a separarse de las aletas dorsal y anal por unos estrechamientos en la membrana que irán produciendo cada vez una escotadura más profunda. Se acentúa la pigmentación en las zonas dorsal y anal. En *A. transmontanus* la escotadura en el pliegue de la membrana aletil (FF), en el pedúnculo caudal que dará lugar a las futuras aletas dorsal, anal y caudal comienza a los 4 dpe. En el Estadio 40 (2 – 3 dpe, 17° C; 3 – 4 dpe 15° C), la parte ventral de la aleta caudal se amplía debido a que sigue aumentando la escotadura que separará las aletas caudal y anal posteriormente. En el Estadio 41 la cola se curva suavemente hacia arriba, debido en parte a la torsión que va sufriendo el extremo final de la notocorda. Las tres aletas al final de la etapa de embrión de vida libre, Estadio 45, aún no están separadas completamente pero sí aparecen definidas debido, en parte, a que la escotadura entre ellas es más pronunciada.

En la etapa juvenil, Estadio 47, (9 – 10 dpe, 15° C) la escotadura entre las aletas dorsal – caudal y anal- caudal se marca bastante más por la formación de unos pliegues. También, comienzan a aparecer los primeros radios en la aleta dorsal y en la parte superior

de la aleta anal. En *A. transmontanus* se ha descrito que los radios de la aleta anal son evidentes a los 10 dpe y se extienden a los 13 dpe (Wang *et al.*, 1985). En el Estadio 49 (14 – 26 dpe) se marcan bastante más los pliegues de separación entre las tres aletas. La membrana de la aleta caudal es más estrecha en su parte superior y más ancha en la inferior, la caudal está más doblada hacia arriba pero su extremo final tiende a doblarse hacia abajo como formando un lóbulo. En el estadio 51 (66 – 96 dpe) la aleta caudal adquiere la forma que mantendrá en el adulto independientemente de que pueda estar más o menos cubierta de pequeñas placas. Al igual que con los escudetes creemos que se necesita más tiempo para que alcancen el aspecto final que mantendrán de adultos.

Consideramos que todas las aletas, tanto pares como impares, al final del Estadio 51 alcanzan su forma definitiva. Su aspecto, sin embargo, puede seguir variando ya que en los meses posteriores es posible que aumente sensiblemente su pigmentación y se cubran de pequeñas placas. Aunque no era objeto de este estudio, hemos observado juveniles de *A. naccarii*, de algo más de 5 meses pe en los que también el cuerpo aparece cubierto de pequeñas placas que parecen ser características de cada individuo. Aunque todos los que hemos observado las presentan, el patrón de distribución de las mismas difiere de unos ejemplares a otros por lo que esto podría considerarse como algo típico de cada ejemplar.

Escudetes

Hacia el final de la etapa de embrión de vida libre, en el Estadio 44 (4 - 5 dpe, 15° C; 6-7 dpe, 17° C), en la parte dorsal del pliegue de la membrana aletil (FF) aparece una zona más densa que cubre algo más de la mitad de la anchura del pliegue y que constituye el rudimento de los escudetes dorsales. En el Estadio 45 (5 dpe; 15° C; 7 dpe; 17° C), se separan los rudimentos de los escudetes dorsales que se ven sobre el pliegue de la membrana aletil de forma independiente. A partir de este momento nosotros hemos observado en los diferentes ejemplares que presentan ya un número variable de SD y que pueden contarse claramente, en concreto hemos observado de 8 – 14 SD^{1º} en todos los individuos estudiados. En *A. transmontanus* se observan 10 futuros escudetes a los 18 dpe (Wang *et al.*, 1985)

Al inicio de la etapa juvenil, en el Estadio 46, (8 dpe; 15° C), los SD se observan como estructuras independientes de colágeno denso a partir del que se forman las estructuras cartilaginosas y posteriormente el hueso. En este estadio también se distinguen a ambos lados del cuerpo, dos filas blanquecinas que son las que darán lugar a los escudetes laterales. En el Estadio 47 (9 – 10 dpe, 15° C), los SD alcanzan el borde de la membrana aletil. Se observan otras dos franjas marcadas a ambos lados de la válvula

espiral que son los futuros escudetes ventrales (SV). En el Estadio 48 (11 – 13 dpe), los escudetes dorsales ensanchan su base y comienzan a sobrepasar el borde de la membrana aletil a la vez que ésta se va reabsorbiendo. Además el extremo de los SD se va curvando hacia atrás. En este Estadio nos hemos percatado de un detalle bastante importante respecto a los escudetes dorsales, no descrito hasta el momento, que es la aparición de una serie de escudetes dorsales secundarios (SD2°), pensamos que el origen de estos escudetes podría ser diferente al de los escudetes primarios. Mientras los primeros son estructuras que provienen del mesénquima y se forman de las células del colágeno, los SD2° aparecen de forma distinta. No se presentan en un lugar concreto ni de una forma determinada. Por lo que hemos visto aparecen en ejemplares que hasta el momento presentaban 8, 9, 10, 11 ó 12 escudetes, aunque no los hemos encontrado en los ejemplares observados que presentaban inicialmente 13 ó 14 escudetes. Sin embargo, no descartamos que la aparición de estos SD2° pueda no ser al azar, ya que también hemos observado en un mismo ejemplar que pueden aparecer uno o varios SD2°, casi siempre coincidiendo con los ejemplares que mostraban inicialmente un número menor de SD1°. Su localización también es variable de unos individuos a otros. Por lo que se ha podido observar entendemos que este proceso se extiende en el tiempo al menos hasta después de los 3 meses pf y que además deber existir un momento en el que el número de escudetes dorsales se estabilice dentro del rango característico descrito para *A. naccarii*, (según Holcik entre 10 – 14). Esto concuerda con las consideraciones de otros autores que piensan que es arriesgado utilizarlo como carácter taxonómico y de ahí la propuesta de utilizar diferentes índices para caracterizaciones taxonómicas (Soljan, 1975; Sokolov *et al.*, 1986; Holcik, 1989; Hernando *et al.*, 1999; Loy *et al.*, 1999 y Costa *et al.*, 2006). En el Estadio 49 (14 – 26 dpe) se produce la reabsorción de la membrana aletil de la parte anterior a la posterior disminuyendo la anchura y longitud de ésta. Si bien es cierto que este es un proceso continuo a lo largo de los diferentes estadios, es en éste donde parece acentuarse más ya que los primeros SD quedan libres.

En el Estadio 50 (26 – 66 dpe; 1 – 2 meses) aparecen externamente los escudetes laterales (SL) y ventrales (SV). En *A. transmontanus* los escudetes laterales están formados a los 20 dpe (Wang *et al.*, 1985). Estos escudetes a diferencia de los dorsales se encuentran formados bajo la piel, con aspecto externo de líneas claras y brillantes que al hacerse externo aparecen todos a la vez. En este estadio la membrana de los escudetes dorsales desaparece completamente por lo que los SD se observan como placas, incluso en los ejemplares sometidos a tinción pueden verse líneas de crecimiento de incrementos muy pequeños, diarios e incluso podrían ser de horas. En el Estadio 51 (66 – 96 dpe), los SL y SV se van ensanchando y aplanando adquiriendo la forma de placas. Los SD1° están

totalmente formados pero en algunos ejemplares siguen apareciendo SD2°. Podemos afirmar que al menos hasta los 3 meses pe (96 dpe) siguen apareciendo SD2° y que no sabemos hasta cuando podrían seguir apareciendo, ya que el estadio juvenil es bastante más largo que los anteriores. La secuencia de aparición de los escudetes es bastante clara, los SD1° son los primeros en aparecer y lo hacen en la etapa de embrión de vida libre entre los 6 -7 dpe, 15° C; los SL son los siguientes en aparecer a los 8 dpe pero ya en la etapa juvenil y 1-2 días después lo hacen los SV. Pero externamente no se observan hasta los 40 dpe. Los SD2° aparecen en el Estadio 48 entre los 11 – 13 dpe y se extienden más allá del Estadio 51.

Otro hecho que refuerza que los escudetes alcancen su número y patrón definitivo a lo largo de la etapa juvenil pero más tarde del Estadio 51, es que una vez formadas y separadas las diferentes aletas impares y habiendo quedado el pedúnculo caudal libre, aparecen los escudetes, unos postdorsales (aparecen después que se haya formado la aleta dorsal y se extienden por el pedúnculo caudal hacia la aleta caudal y otros postanales, (entre la aleta anal y la caudal). El patrón de aparición de dichos escudetes varía entre los ejemplares pudiéndose reconocer dos o tres escudetes y además poseen la particularidad de que están rodeados de pequeñas placas o pínulas. Este fenómeno no es característico de *A. naccarii*, ya que en la guía de identificación CITES (2001) se utiliza como carácter taxonómico entre los diferentes Acipenséridos. Además acompañando a estas placas o escudetes se encuentran una serie de pínulas y placas formando un dibujo, diferente de unos individuos a otros aunque manteniendo una similitud, por lo que consideramos que de persistir esta disposición en el animal adulto podría considerarse como en otros animales la “huella dactilar” de *A. naccarii*.

Pínulas

Son unas estructuras óseas que comienzan a observarse en el Estadio 47 (9 – 10 dpe, 15° C) en la parte dorsal de la cabeza, por detrás de los ojos, inicialmente se observan dos a cada lado y llegan a la altura donde comienza la membrana aletil (FF). En el Estadio 48 (11 – 13 dpe, 15° C) las pínulas al tiempo que aumentan su tamaño, se curvan hacia atrás e incrementan su número a ambos lados de la cabeza. El número es variable de un ejemplar a otro. Sin embargo, en el siguiente estadio, Estadio 50 (26 – 26 dpe) se establece un patrón de distribución de las mismas similar de unos ejemplares a otros describiendo un arco justo por detrás del opérculo y ampliándose por toda la cabeza, desde el morro hacia donde comienzan los SD. Parece que este patrón se mantiene a partir de este momento.

3. Análisis morfométricos

La mayoría de los autores que han trabajado en el análisis de medidas en diferentes especies de esturiones coinciden en la necesidad de establecer criterios merísticos y morfométricos para facilitar la comparación entre las distintas especies. (Loy *et al.*, 1999; Nort *et al.*, 2002; Snyder *et al.*, 2002). Es importante para la investigación la búsqueda de una metodología adecuada en la toma de muestras y recogida de datos para obtener información precisa de cara a los métodos que se vayan a utilizar. Además muchos caracteres pueden estar sujetos a interpretación. Algunos autores como North *et al.*, (2002) detallaron procedimientos para medidas morfométricas y caracteres merísticos de *A. medirostris* que pueden establecerse para facilitar la comparación de datos entre diferentes estudios. En el caso del *A. medirostris*, se han visto diferencias individuales fácilmente distinguibles a simple vista, reafirmando la necesidad de reunir una muestra representativa. Los caracteres merísticos parecen ser fáciles de evaluar y provechosos porque pueden tomarse muchos valores a lo largo de la vida del pez. Sin embargo, los datos merísticos no pueden probar cuáles de estas medidas son necesarios para discernir entre las distintas poblaciones de la misma especie.

Muchos estudios han demostrado la plasticidad morfológica del género *Acipenser* (Ruban & Sokolov, 1986; Sokolov *et al.*, 1986; Ruban, 1989; Guenette *et al.*, 1992; Ruban & Panaiotidi, 1994). La identificación de especies es algo difícil, debido a esta plasticidad, a la variabilidad individual, y complicado por la intervención y manipulación humana, acuicultura, hibridación, la contaminación (Shagaeva *et al.*, 1993) y alometría. Algunos autores han propuesto el uso de las medidas geométricas (Bookstein, 1991; Rohlf & Marcus, 1993; Marcus *et al.*, 1996) para caracterizar los cambios en la forma de la región craneal durante el crecimiento del esturión *A. naccarii*.

En nuestro estudio sobre las diferentes medidas realizadas para *A. naccarii*, se han relacionado en todos los casos la longitud de las distintas medidas realizadas sobre la aleta caudal, aletas pectorales, saco vitelínico y distintas medidas cefálicas con el tiempo y con la longitud, total en el caso de las aletas y saco vitelínico y cefálica en el caso de las distintas medidas realizadas en la cabeza.

En todos los casos se observó un peor ajuste cuando las medidas se relacionaron con el tiempo que con la longitud total o longitud de la cabeza. Esto se debe a la diferencia intrínseca de tamaños, para una misma edad, propia de cada especie que se acentúa aún más en aquellas procedentes de la acuicultura. Las diferencias de tamaños entre ejemplares de la misma edad y más aún en etapas muy tempranas es relativamente más elevada por lo

que a lo largo del tiempo las diferencias se incrementan aún más. Por ello resulta más fiable la relación entre longitudes. Las diferentes Acipenséridos en cultivo exponen una amplia variación de tamaños en etapas juveniles, además la variación de tamaño de los embriones de vida libre y juveniles impone un problema práctico para los acuicultores, requiriendo procedimientos de clasificación en los que se emplea mucha mano de obra lo que resulta agotador y estresante para los peces. Varios factores exógenos pueden contribuir a estas variaciones de tamaño en condiciones dadas en cultivos y posiblemente afectar al cultivo del esturión en general. Entre ellos están: (i) la proporción de comida, frecuencia de alimentación, tamaño del alimento (Goldan *et al.*, 1997), (ii) interacciones competitivas tempranas por el alimento entre los peces de diferentes tallas, incrementándose con el tamaño (Kandri *et al.*, 1997), (iii) factores conductuales que influyen en el consumo de energía, como la lucha por la posición, (jerarquías sociales) (Stefanson *et al.*, 2000), y (iv) variabilidad genética dentro de los miembros del grupo (Umino *et al.*, 1997).

Respecto a las aletas, existe una correlación positiva entre las diferentes medidas realizadas y la longitud total, mejor para la aleta caudal que para las pectorales, que aún siendo buenas presentan diferencias entre las aletas. Esta alometría positiva del crecimiento en las etapas tempranas está estrechamente emparejada a las necesidades específicas, como ya probó Gisbert (1999) para *A. baerii*.

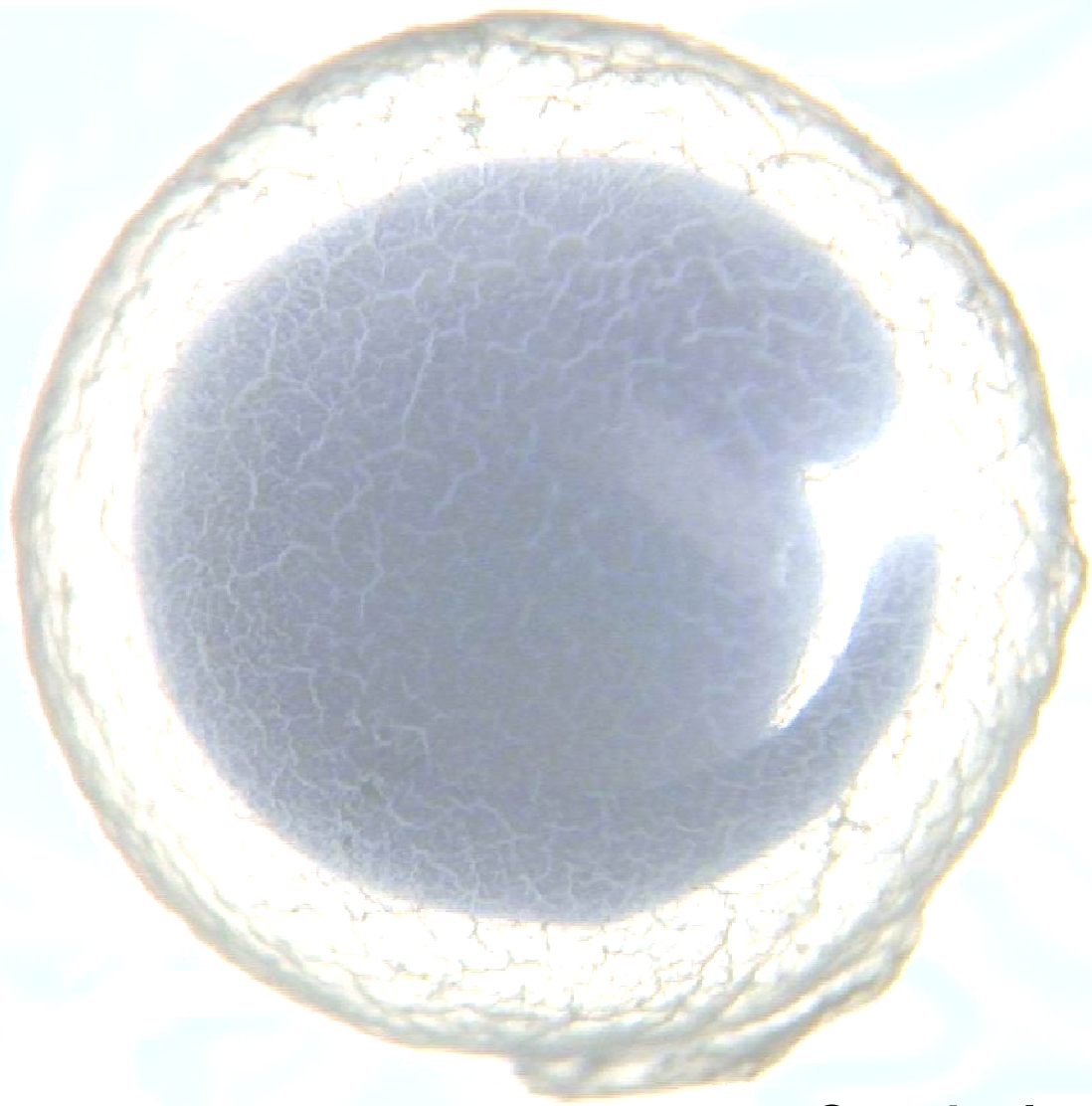
En las medidas del saco vitelínico observamos claramente una relación inversa entre el ancho y el largo del mismo. Es decir, a medida que pasa el tiempo y el embrión va creciendo, las reservas del saco vitelínico se van reabsorbiendo, por lo que disminuye su anchura.

4. Aplicación en Acuicultura

Lo más importante para que las empresas de acuicultura acierten o marchen bien, debe ser el entendimiento de la biología básica de las especies que interesan comercialmente. Tal conocimiento permite tanto optimizar las condiciones de producción como diseñar soluciones efectivas para problemas comunes. Conocer la secuencia de la embriogénesis normal que permita la selección temprana de la producción de criadero, que pueda ayudar a establecer el valor de los individuos de un stock y tomar decisiones sobre la asignación de los recursos, por ejemplo como distribuir en el espacio de cría los diferentes embriones de cada puesta. En este punto, se conoce muy poco del mecanismo de desarrollo de los esturiones y de los defectos inducidos por los diferentes factores exógenos. El empleo de modelos que estudian las anomalías del desarrollo permitiría el diagnóstico de problemas específicos.

Sin embargo, ya que las etapas tempranas de los embriones (estados iniciales) a menudo son más sensibles que en etapas posteriores a las condiciones ambientales, pueden servir como bioindicadores generales en la evaluación de las condiciones del criadero o de la calidad del agua. Entendiendo que las condiciones necesarias para acertar con el desarrollo temprano son también esenciales en los esfuerzos de conservación, si estos implican la preservación o restauración del hábitat, o en los criaderos de embriones de vida libre para su posterior liberación (McCabe & Tracy, 1994).

Finalmente, ahora que los estadios embrionarios son accesibles a través de los programas de acuicultura, los esturiones y peces espátulas tienen potencialmente una gran importancia para los estudios comparativos y evolutivos del desarrollo. Su posición filogenética como grupo fuera de los peces teleósteos, combinada con su desarrollo temprano similar a anfibios, hace de ellos un punto muy valioso y único de comparación tanto para los teleósteos como para estudios con anfibios. El reciente énfasis sobre el desarrollo del pez cebra *Danio rerio* (teleósteo utilizado como una “especie modelo” fundamental para el desarrollo de los vertebrados (Haffter *et al.*, 1996; Metscher & Ahlberg, 1999) aumenta la importancia de los análisis comparativos que incluyen las especies más arraigadas en la filogenia de los vertebrados y que conservan las características más hereditarias del desarrollo.



Conclusiones

CONCLUSIONES

1.- Los huevos de *A. naccarii* presentan un desarrollo holoblástico similar a los descritos para otros Acipenséridos, y segmentación epibólica.

2. La gastrulación a 17° C, que se inicia en el Estadio 13 (21h 30'), es por epibolia como corresponde a los huevos que contienen cantidad moderada de vitelo.

3.- La neurulación a 17° C tiene una duración de 4 horas, se inicia a las 33 hpf (Estadio 19) y finaliza a las 37 hpf (Estadio 23).

4.- Los arcos viscerales, los sacos olfativos y los rudimentos oculares aparecen entre las 38 – 43 hpf, mientras que el rudimento del corazón lo hace a las 49 hpf, a 17° C, su forma en "S" y la contracción activa ocurren entre las 70 – 76 hpf (Estadio 31).

5.- La eclosión (Te) comienza a las 105 h a 17° C y a las 171 h a 15° C, produciéndose la eclosión en masa (Tm) a las 120 h y 186 h respectivamente. El crecimiento de los embriones aumenta al retrasarse el momento de la eclosión con lo que se incrementa la probabilidad de supervivencia.

6.- Se han determinado diferentes estadios en el desarrollo de *A. naccarii* que se engloban en tres periodos: fecundación – eclosión, que a 17° C, comprende los Estadios (1 – 36) y tiene una duración de 5 días (120 h) a 17° C y 7 días 18 h (186 h) a 15° C; embrión de vida libre, comprende los estadios (37 – 45) que dura 5 días (120 h) a 17° C y 7 días (168 h) a 15° C; y el desarrollo juvenil, que se extiende durante 1752 h (73 días). En conjunto el desarrollo estudiado se ha extendido durante 83 días (1992 h) a 17° C y 88 días (2106 h) a 15° C.

7.- Comparando la velocidad de desarrollo de *A. naccarii* con otras especies de esturiones, *A. gueldenstaedti*, especie más cercana filogenéticamente, *A. medirostris* y *A. transmontanus*, ésta es mayor en *A. naccarii*, lo que puede ser una estrategia reproductiva adquirida al compartir hábitat con *A. sturio*.

8.- Cada uno de los periodos en los que se ha dividido el desarrollo embrionario requiere un tiempo determinado y dentro de cada uno de ellos cada estadio transcurre también en una secuencia temporal determinada. *A. naccarii*, presenta un desarrollo embrionario más rápido que otros Acipenséridos, alcanzándose antes los estadios de desarrollo incluso a temperaturas más bajas.

9.- La formación de las aletas se inicia en el Estadio 38 (2 – 3 dpe) con la diferenciación de la aleta pectoral por encima del saco vitelínico seguida de las restantes aletas (tanto pares como impares), que terminan su diferenciación al final de la etapa

juvenil. Mientras que los escudetes tienen un inicio más tardío, en el Estadio 46 (8 dpe) con la formación de los escudetes dorsales (SD). Tanto los escudetes laterales (SL) como los ventrales (SV) aparecen más tarde, en el Estadio 50 (26 – 66 dpe).

10.- Los escudetes dorsales (SD) son los primeros en aparecer y lo hacen de forma independiente, mientras que los escudetes laterales (SL) y (SV) cuando aparecen lo hacen a la vez y extendiéndose en filas longitudinales.

11.- Describimos por primera vez para un Acipensérido, la aparición de los escudetes dorsales secundarios (SD2^o) que no aparecen al mismo tiempo que los primarios y se presentan en número variable y en posiciones diferentes a lo largo de la fila de escudetes dorsales.

12.- Los escudetes post-dorsales y post-anales aparecen una vez que se han formado las aletas dorsal, caudal y anal y el pedúnculo caudal queda libre. El dibujo o patrón que presentan los ejemplares estudiados es original y característico de cada ejemplar.

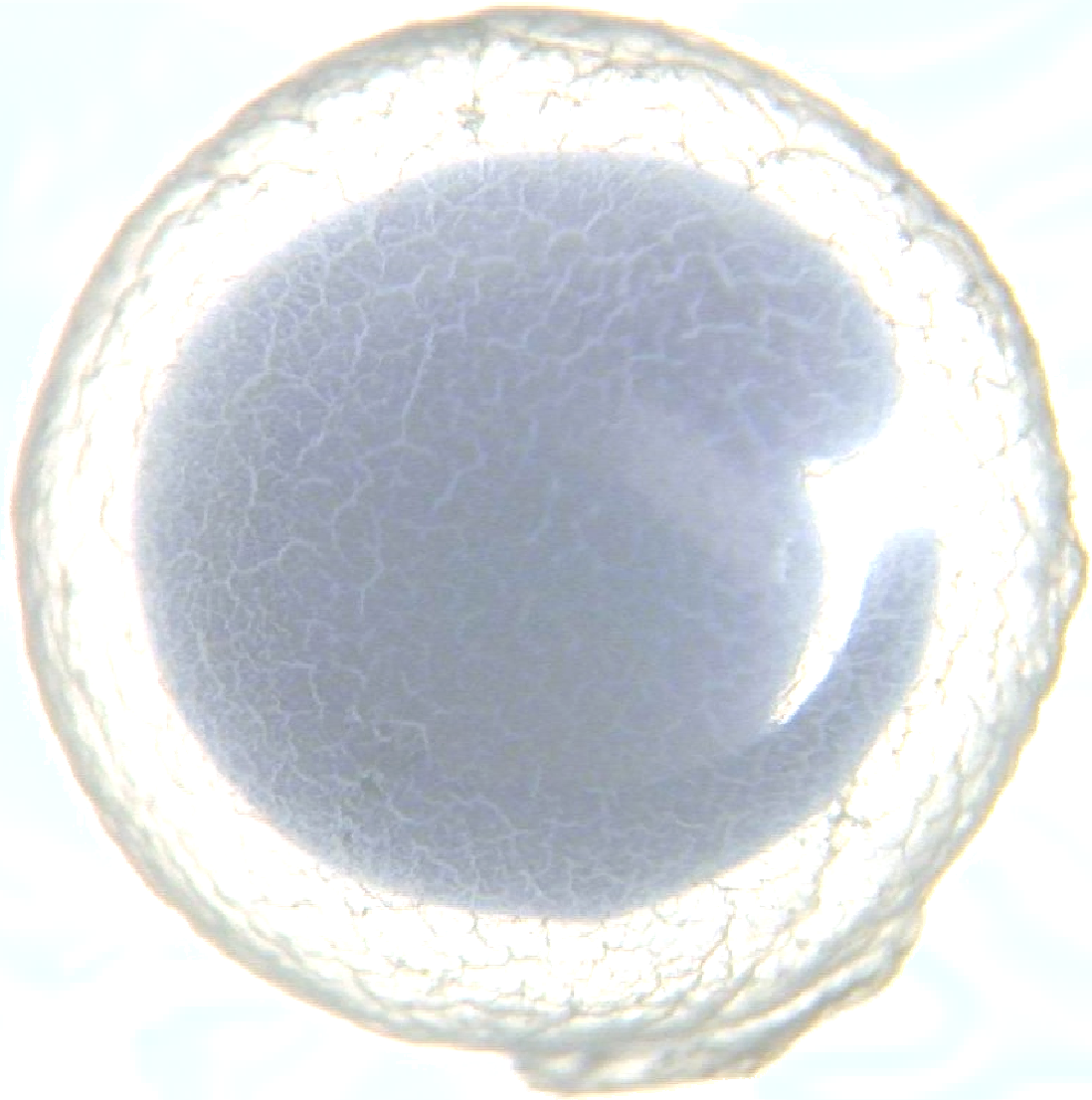
13.- Se han propuesto por primera vez seis nuevos estadios para la etapa juvenil, sin descartar que pudiese haber alguno más.

14.- Aunque todas las longitudes estudiadas tienen correlación con el tiempo. Las longitudes de las aletas pectorales, caudal y saco vitelínico se correlacionan mejor con la longitud total, mientras que las longitudes cefálicas lo hacen con la longitud de la cabeza.

15.- Como el rango de temperaturas que permite el desarrollo normal es crítico en la reproducción de los peces, el conocer la tolerancia y fundamentalmente las temperaturas óptimas para el desarrollo de los embriones puede ayudar a aumentar la supervivencia en la eclosión en acuicultura, disminuyendo la mortalidad en estas etapas tempranas, y contribuyendo a su protección en caso de los esturiones salvajes.

16.- Todos los estadios descritos para *A. naccarii* pueden aplicarse en acuicultura y además para la comparación con otros Acipenséridos.

17.- Se ha elaborado por primera vez para *A. naccarii* un modelo global que relaciona la morfogénesis a nivel macroscópico y los diferentes sistemas orgánicos, obteniéndose un mejor conocimiento sobre sus pautas de desarrollo y se establece un cronograma de aparición de las principales estructuras.



Bibliografía

- Agnisola, C., Mckenzie, D. J., Pellegrino, D., Bronzi, P., Tota, B. & Taylor, E. W., (1999). Cardiovascular-responses to hypoxia in the Adriatic sturgeon (*Acipenser naccarii*). *J. Appl. Ichthyol.* 15: 67 – 72.
- Agnisola, C., Mckenzie, D. J., Taylor, E. W., Bolis, C. L. & Tota, B. (1996). Cardiac performance in relation to oxygen supply varies with dietary lipid composition in sturgeon. *Am. J. Physiol.* 271: 417 – 25.
- Akimova, N.V. & Ruban, G.I. (1993). The condition of the reproductive system of the Siberian sturgeon, *Acipenser baeri*, as a bioindicator. *J. Appl. Ichthyol.* 33: 15 – 24.
- Akimova, N.V. & Ruban, G.I. (1996). A classification of reproductive disturbances in sturgeons (Acipenseridae) caused by an anthropogenic impact. *J. Appl. Ichthyol.* 36: 65- 80.
- Albuquerque, R. M. (1956). Peixes do Portugal e ilhas adjacentes. Chaves para a sua determinação. Portugal. *Acta Biologica.* (B): 5 – 1164 (pag 165).
- Anonouyms, (1818). Observações sobre algunos peixes do mar e rios do Algarve. *Memorias Academia Real do Sciencia Lisboa.* 5, 2: 1 – 48.
- Ayres, W.E. (1854). Descriptions of new species of California fishes. *Proc. Calif. Acad. Sci.* 1: 1–22.
- Balinsky, B. I. (1978). Introducción a la embriología. Editorial Omega. 644 pp.
- Balinsky, B.I. (1983). Introducción a la embriología. Editorial Omega. 727 pp.
- Ballard, W.W. and Ginsburg, A.S. (1980). Morphogenetic movements in acipenserid embryos. *J. Exper. Zool.* 213: 69 - 103.
- Ballard, W.W. and Needham, R.G. (1964). Normal embryonic stages of *Polyodon spathula* (Walbaum). *J. Morphol.* 114: 465 - 478.
- Balon, E.K. (1975). Terminology of intervals in fish development. *J. Fish. Res. Board of Canada* 32, 1663 – 1670.
- Balon, E.K. (1999). Alternative ways to become a juvenile or a definitive phenotype (and on some persisting linghistic offenses). *Env. Biol. Fish.* 56: 17 – 36.
- Barannikova, I. A. (1954). The Termination of the Process of Passing into the Spawning State of Female and Male Hiemal Sturgeon of the Autumn Run after the Exclusion of the Period of Spawning Migration. *Dokl. Akad. Nauk SSSR* 99 (4), 641–644.
- Bauchot, M. L. (1987). Poissons osseux. In: W. Fischer, M.L. Bauchot & M. Schneider (eds.), *Fishes FAO d'identification pour les besoins de la pêche (rev.1). Méditerranée et mer Noire. Zone de pêche* 37, vol.II. Commissions des Communautés Européennes and FAO, Rome, pp.891 – 1421.
- Beer, K.E. (1981). Embryonic and larval development of the white sturgeon (*Acipenser transmontanus*). Master's thesis, University of California, Davis. USA.

- Bemis, W.E., Findeis, E. K. & Grande, L. (1997). An overview of Acipenseriformes. *Env. Biol. Fish.* 48: 25 – 71.
- Bemis, W.E. & Grande, L. (1992). Early development of the Actinopterygian head. I. External development and staging of the paddlefish *Polyodon spathula*. *J. Morphol.* 213: 47 - 83.
- Bemis, W.E. & B. Kynard. (1997). Sturgeon rivers: an introduction to acipenseriform biogeography and life history. *Env. Biol. Fish.* 48: 167 – 183.
- Berg, L.S. (1904). Zur Systematik der Acipenseriden. *Zool. Anz.* 27: 665 – 667.
- Berg, L.S. (1932). Übersicht der Verbreitung der Süßwasserfische Europas. *Biogeographica* 1: 107 – 208.
- Billard, R. (2002). Esturgeons et caviar. Aquaculture – Pisciculture. Ed. Tec & Doc. Lavoisier. Paris. 298 pp.
- Birstein, V.J. & Bemis, W.E. (1997). How many species are there within the genus *Acipenser*? *Env. Biol. Fish.* 48: 157 – 163.
- Boglione, C., Marino, G., Bertolini, B., Rossi, A., Ferreri, F. & Cataudella, S. (1993). Larval and postlarval monitoring in seabass: morphological approach to evaluate finfins seed quality. Productio, Environment and Quality. Bordeaux Aquaculture '92. *European Aquac. Soc.* special publication 18: 1 – 16.
- Boglione, C., Bronzi, P., Cataldi, E., Serra, S., Gagliardi, F. & Cataudella, S. (1999). Aspects of early development in the Adriatic sturgeon, *Acipenser naccarii*. *J. Appl. Ichthyol.* 15: 207 – 213.
- Bolker, J.A. (1993a). Embryonic development in the white sturgeon, *Acipenser transmontanus*. Ph. D. dissertation. University of California, Berkeley. USA.
- Bolker, J.A. (1993b). Gastrulation and mesoderm morphogenesis in the white sturgeon. *J. Exper. Zool.* 266: 116 - 131.
- Bolker, J.A. (1993c). The mechanism of gastrulation in the white sturgeon. *J. Exper. Zool.* 266: 132-145.
- Bolker, J.A. (1994). Comparison of gastrulation in frogs and fish. *Amer. Zool.* 34: 313-322.
- Bolker, J.A. Embryology. (2004) *G.T.O.* LeBreton et al. (eds.), *Sturgeons and Paddlefish of North America*, (Chapter 6), 134–146. Kluwer Academic Publishers. Netherlands.
- Bonaparte, C. L. (1836). Iconografia della fauna italica per le quattro classi degli animali vertebrate. 3. Roma.
- Bookstein, F.L. (1991). Morphometric tools for landmark data. *Cambridge Univ. Press.*
- Brandt, J.F. (1833). In: Brandt, J.F. and J.T. Ratzeburg – Medizinische. *Zoologie.* 2. Berlin.

- Bronzi, P., Rosenthal, H., Arlati, G. & Williot, P. (1999). A brief overview on the status and prospects of sturgeon farming in Western and Central Europe. *J. Appl. Ichthyol.* 15: 224 – 227.
- Bruch, R. M. & Binkowski, F. P., (2002). Spawning behavior of lake sturgeon (*Acipenser fulvescens*). *J. Appl. Ichthyol.* 18: 570–579.
- Buddington, R.K. & Christofferson, J.P. (1985). Digestive and feeding characteristics of the chondrosteans. *Environ. Biol. Fishes* 14 (1): 31-41.
- Buddington, R.K. & Doroshov, S.I. (1986b). Digestive enzyme complement of white sturgeon (*Acipenser transmontanus*). *Comp. Biochem. Physiol.* 83A: 561–567.
- Buddington, R.K. & Doroshov, S.I. (1986). Development of digestive secretions in white sturgeon juveniles (*Acipenser transmontanus*). *Comp. Biochem. Physiol.* 83A: 233–238.
- Camacho, S. (2008). Desarrollo y caracterización estructural de los receptores sensoriales relacionados con la alimentación en *Acipenser naccarii*. Tesis Doctoral. Universidad de Granada. 250 pp.
- Canestrini, G. (1861). Catalogo dei pesci del golfo di Genova. *Arch. Zool. Anat. Moderna* 1: 262 – 267.
- Canestrini, G. (1866). Prospetto critico dei pesci d' acqua dolce d'Italia. *Arch. Zool. Anat. Moderna* 4: 47 – 187.
- Capello, F. B. (1869). Catálogo do peixes do Portugal que existem no Museo de Lisboa. *Jorn So Math Phys Nat.* 1ª serie, 2: 131 – 193.
- Capello, F. B. (1880). Catálogo do peixes do Portugal. *Memorias Academia Real do Sciencia Lisboa*, 6: 1 – 78.
- Carlson, D. M. (2000). *A recovery plan for the lake sturgeon (Acipenser fulvescens) in New York*. N.Y. State Dept. Environ. Cons., Div. Fish and Wildlife, Bureau of Fisheries, Endangered Fish Project, Albany, New York, USA, 16 pp.
- Carroll, R.L. (1988). *Vertebrate Paleontology*. WH Free-man, New York.
- Carroll, R.L. (1998). Limits to knowledge of the fossil record. *Zoology*, 100: 221 – 231.
- Cataldi, E., Ciccotti, E., Di Marco, P., Di Santo, O. & Caudella, S. (1995). Acclimation trials of juvenile Italian sturgeon to different salinities: morphophysiological descriptors. *J. Fish Biol.* 47: 609 – 618.
- Chapman, F.A. & Carr, S.H. 1995. Implications of early life stages in the natural history of the Gulf of Mexico sturgeon, *Acipenser oxyrhynchus desotoi*. *Env. Biol. Fishes.* 43: 407-413.
- Chambers, R.C. & Leggett, W.C. (1987). Size and age at metamorphosis in marine fishes: An analysis of lab-reared winter flounder *Pseudopleuronectes americanus* with a review of variation in other species. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 44: 1936–1947.

- Chambers, R.C., Leggett, W.C. & Brown, J.A. (1989). Egg size, female effects, and the correlations between early life history traits: An appraisal of the individual level. The Early Life History of Fish. *The Third ICES Symposium Bergen, 3–5 October, 1988, 1989.* 191: 439–447.
- Choudhury, A. & Dick, T.A. (1998). The historical biogeography of sturgeons (Osteichthyes: Acipenseridae): a synthesis of phylogenetics, paleontology and paleogeography. *J. Biogeography* 25: 623 – 640.
- CITES (2001). Guía de identificación de los esturiones y espátulas protegidos por la Convención sobre el Comercio Internacional de Especies Amenazadas de Fauna y Flora silvestres. *Ministerio de Medio Ambiente de Canadá.* ISBN 0-660-614641-6.
- Classen, T.E.A. (1936). Notas preliminares sobre la biología y el aprovechamiento del esturión en el Guadalquivir. *Pub. Sección de pesca, Ministerio de Agricultura, Industria y Comercio.* Serie 1,2: 15 – 41.
- Classen T.E.A. (1944). Estudio bioestadístico del esturión o sollo del Guadalquivir (*Acipenser sturio*). *Trab. Inst. Esp. Oceanog.* n° 19: 1 – 112.
- Conte, F., Doroshov, S.I., Lutes, P.B. and Strange, E.M. (1988). *Hatchery manual for the white sturgeon, Acipenser transmontanus Richardson, with application to other North American Acipenseridae.* U.C. Regents, Oakland, CA..
- Crocker, C. E., Farrell, A. P. Gamperl, A. K. & Cech, J.J. Jr. (2000). Cardiorespiratory responses of white sturgeon to environmental hypercapnia. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 279: 617 – 628.
- Danlas, Ch., Economou, N.A. & Bantavas, I. (1991). Osteological abnormalities in laboratory reared sea-bass (*Dicentrarchus labrax*) fingerlings. *Aquaculture* 97: 169 – 180.
- Dean, B. (1895). The early development of gar-pike and sturgeon. *J. Morphol.* 11: 1-62.
- De Betta, E. (1862) Ittiologia Veronese. *Mem. Acad.. Agric. Comm. Arti Verona* 41: 259 – 409.
- De la Herrán, R., Fontana, F., Lanfredi, M., Congiu, L., Leis, M., Rossi, R., Ruiz Rejón, C., Ruiz Rejón, M. & Garrido-Ramos, M.A. (2001). Slow rates of evolution and sequence homogenization in an ancient satellite DNA family of sturgeons. *Mol. Biol. Evol.* 18: 432–436.
- Deng, X., Van Eenennaam, J.P. & Doroshov, S. I. (2002). Comparison of early life stages and growth of green and white sturgeon. Pag. 237 – 248. *In: Biology, management, and protection of North American sturgeon.* Edited by W. Van Winkle, P.J. Anders, D.H. Secor, and D.A. Dixon. *Am. Fish. Soc. Symp.* 28. Bethesda, Maryland. USA..
- Derzhavin, (1947). Reproduction of reserves of Acipenserid fishes. *Izdatel'stvo Akad nauk AzSSR, Baku,* (en ruso).
- Detlaff, T.A. (1953). Dependence of the rate of cleavage of sturgeon eggs on temperature. *Dokl. Akad. Nauk. SSSR.* 91:695-698.

- Detlaff, T. A.; Detlaff, A. A., (1961). On relative dimensionless characteristics of development duration in embryology. *Arch. Biol.* 72: 1–16.
- Detlaff, T. A. & Ginsburg, A. S. (1954). The embryonic development of Acipenserid fishes (stellate, Russian and giant sturgeon) with referente to the problems of their breeding. *Izdatel'stvo Akad Nauk SSSR.* (en ruso).
- Detlaff, T. A. & Ginsburg, A. S. (1963). Acrosomal reaction in Acipenserid fishes and the role of calcium ions in gamete fusion. *Dokl Akad Nauk SSSR*, 153: 1461 – 1464.
- Detlaff, T. A. & Zubova, C. E. (1962). The ratiobetween durations of the period of maturation and embryogenesis in the Russian and stellate sturgeons. *Dokl Akad Nauk SSSR*, 143: 746 – 748.
- Detlaff, T. A., Nikitina, L. A. & Stroeva, O. G. (1964). The role of the germinal vesicle in oocyte maturation in anurans as revealed by the removal and transplantation of nuclei. *J. Embryol. Exp. Morphol.* 12: 851–873.
- Detlaff, T. A., Vassetzky, S. G. & Davydova, S. I. (1965). Recommendations for obtaining eggs in acipenserid fishes after pituitary injection. Glavrybvod, Moscow. (in ruso).
- Detlaff, T. A. (1966). Action of actinomycin and puromycin upon frog oocyte maturation. *J. Embryol. Exp. Morphol.* 16: 183–195.
- Detlaff, T. A. & Skoblina, M.N. (1969). The role of germinal vesicle in the process of oocyte maturation in Anura and Acipenseridae. *Ann. Embryol. Exp. Morphol.* (Suppl) 1: 133 – 151.
- Detlaff, T.A., Ginsburg, A. S. & Schmalhausen, O.I. (1981). Development of Acipenserid fishes. Maturation of oocytes. *Sov. J. Dev. Biol.* 11: 17 – 22.
- Detlaff, T.A. Ginsburg, A.S. & Schmalhausen, O.I. (1993). *Sturgeon Fishes. Developmental Biology and Aquacultura.* Springer – Verlag, Berlin. 300 pp.
- Detlaff, T.A. & Goncharov, B.F. (2002). Contribution of developmental biology to artificial propagation of sturgeon in Russia. *J. Appl. Ichthyol.* 18(4-6):266-270.
- DiMichele, L. & Powers, D. A. (1992). Ldh-B genotype specific hatching times of *Fundulus heteroclitus* embryos. *Nature* 296, 560 – 563.
- DiMichele, L. & Westerman, M.E. (1997). Gepgraphic variation in development rate between populations of the teleost *Fundulus heteroclitus* attributes. *Mar. Biol.* 128, 1 – 7.
- Dingerkus, G. & Uhler, L.D. (1977). Enzyme clearing of alcian blue stained whole small vertebrates for demonstration of cartilage. *Stain Technol.* 52: 229 – 232.
- Domezain, A. (2003). La acuicultura como herramienta para la recuperación de especies. El esturión autóctono de la Península Ibérica *Acipenser naccarii*, B. 1836. Tesis Doctoral. Universidad de Granada.

- Doroshov, S.I., Moberg, G.P. & Van Eenennaam, J.P. (1997). Observations on the reproductive cycle of cultured white sturgeon, *Acipenser transmontanus*. *Environ. Biol. Fish.* 48: 2265 - 278.
- Economidis, P. S., (1972). Catálogos ton ichthyon tes Ellados. *Hell. Ocean. Limnol.* Athens 11: 421 - 598.
- Elbal, M.T. (2000). Desarrollo larvario de teleósteos: caracterización histológica de las distintas fases en el desarrollo del tracto digestivo. En: *Acuicultura I: Reproducción y desarrollo*. Eds. Zamora, S., Agulleiro, B. & García Hernández, P. Servicio de Publicaciones de la Universidad de Murcia. 447 pp.
- Emel'yanov, S.V. & Sytina, L.A.. (1967). Larvae of Acipenserid fishes at hatching, their structure and variability. *Tr TsNIORKh* 1: 152 - 162.
- Faustino, M. & Power, D.M. (1998). Development of osteological structures in the sea bream: vertebral column and fin complex. *J. Fish Biol.* 52: 11 - 22.
- Francillon, H. & Meunier, F. J. (1985). Conservation et presentation des preparations coloreés au bleu alcian et a l'alizarine. *Cybium* 9: 121 - 126.
- Festa, E. (1892). I pesci del Piemonte. *Boll. Mus. Zool. Anat. comp.* Torino 7 (129): 6p.
- Findeis, E.K. (1993). Skeletal anatomy of the North American shovelnose sturgeon. *Scaphirhynchus platorynchus* (Rafinesque, 1820) with comparisons to other Acipenseriformes. Ph D thesis. University of Massachusetts, Amherst.
- Fitzinger, L. J., & J. Heckel, (1836). Monographische Darstellung der Gattung *Acipenser*. *Ann. Wien. Mus.* 1: 261 - 326.
- Fontana, F. (1976). Nuclear DNA content and cytometri of erythrocytes of *Huso huso* L., *Acipenser sturio* L. and *A. naccarii* Bonaparte. *Caryologia* 29: 127 - 138.
- Fontana, F. & G. Colombo, (1974). The chromosomes of Italian sturgeons. *Experientia* 30: 739 - 741.
- García, A. (2000). Desarrollo larvario de peces: alimentación de larvas. En *Acuicultura I: Biología marina. Reproducción y desarrollo*. Eds. Zamora, S., Agulleiro, B. y García Hernández, M. Servicio de Publicaciones de la Universidad de Murcia. Universidad Internacional del Mar. 447 pp.
- García Hernández, M.P., Lozano, M.T., Elbal, M.T. & Agulleiro, B. (2001). Development of the digestive tract of sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.). Light and electron microscopic studies. *Anat. Embryol.* 204: 39-57.
- Gardiner, B.G. (1984). Sturgeons as living fossils. (ed. By N. Eldredge and S. M. Stanley), pp. 148 - 152. Springer Verlag. New York.
- Gardiner, B.G. (1984). The relationships of the paleoniscid fishes: a review based on new specimens of *Mimia* and *Moythomasia* from the upper Devonian of Western Australia. *Bull. Brit. Mus. Nat. Hist. Geol. Serv.* 37: 173 - 248.

- Garrido-Ramos M.A., Soriguer M.C., Herranz R. de la, Jamilena M., Ruiz Rejón C., Domezain A., Hernando J.A. & Ruíz Rejón M. (1997). Morphometric and genetic analysis s proof for the existence of two sturgeon species in the Gualquivir river. *Mar. Biol.* 129: 33 – 39.
- Gavaia, P.J. Sarrasquete, C. & Cancela, M.L. (1999). Detection of mineralised structures in early stages of development of marine teleostei using a modified Alcian blue – Alizarin red double staining technique for bone and cartilage. *Biotechnic & Histochemistry*, vol 75: No.2.
- Gawlicka, A. Teh, S.J. Hung, S.S. Hinton, D.E. & De la Noue, J. (1995). Histological and Histochemical changes in the digestive tract of white sturgeon larvae during ontogeny. *Fish. Physiol. and Biochemistry* 14, 357-371.
- Gerhart, J., Danilchik, M., Doniach, T., Roberts, S., Rowning, B. & Stewart, R. 1989. Cortical rotation of the *Xenopus* egg: consequences for the anteroposterior pattern of embryonic development. *Development* 107. *Supplement*.
- Gerbil'skii, N.L. (1941). Method of pituitary injections and its role in fish culture.- In: Gerbil'skii, N.L. (ed) Method of pituitary injections and its role in reproduction of fish resources. LGU Press, Leningrad, pp 5 – 35.
- Gerbil'skii, N.L. (1947). Current state and perspectives on the method of pituitary injections in fish culture. *Tr Lab Osnov Rybovod* 1: 5 – 24.
- Gerbil'skii, N.L. (1949). Experimental and methodical bases of development of the sturgeons culture in the lower Kuban flow. *Tr Lab Osnov Rybovod* 2: 5 – 28.
- Gerbil'skii, N.L. (1962). Theory ob biological progress of the Acipenserid fishes and its use in sturgeon culture, Uch Zap LGU No 311. *Serv. Biol. Science* 48: 5 – 18.
- Giglioli, E. H. (1880). Elenco dei mammiferi, degli uccelli e dei rettili ittiofagi appartenenti alla fauna italica e catalogo degli anfibi e dei pesci italiani. *Cat. Sez. Ital. Espos. Pesca* Berlino: 63 – 117.
- Ginsburg, A.S. (1961). The block to polyspermy in sturgeon and trout with special reference to the role of cortical granules (alveoli). *J. Embryol. Exp. Morph.* 9: 173- 190.
- Ginsburg, A. S.; Dettlaff, T. A. (1955). Development of sturgeon embryos. *Akad. Nauk SSSR*. Moscow (en ruso)
- Ginsburg, A. S.; Dettlaff, T. A. (1969). Development of acipenserid fishes. Oocyte maturation, fertilization, and embryogenesis. *Nauka*, Moscow (en ruso).
- Ginsburg, A.S. & Dettlaff, T. A. (1975). The Russian sturgeon *Acipenser gueldenstaedti*. In: *Dettlaff, T. A. (ed) Objects of developmental biology*. Nauka, Moscow, pp 217 – 263.
- Ginsburg, A.S. & Dettlaff, T.A. (1991). The Russian sturgeon *Acipenser güldenstädti*. I. Gametes and early development up to time of hatching. In: *Animal species for developmental studies*. Vol. 2, 15 - 33 pp. *Vertebrates*. Edited by Dettlaff, T.A. & Vassetzky, S. G. *Vassetzky (Eds)*. London.

- Gisbert, E., Rodríguez, A., Williot, P. & Castello-Orvay, F. (1998). A histological study of the development of the digestive tract of Siberian sturgeon (*Acipenser baeri*) during early ontogeny. *Aquaculture* 167: 195–209.
- Gisbert, E. (1999). Early development and allometric growth patterns in Siberian sturgeon and their ecological significance. *J. Fish. Biol.* 54: 852–862
- Gisbert, E., Sarasquete, M.C., Williot, P. & Castelló – Orvay, F. (1999). Histochemistry of the development of the digestive system of Siberian sturgeon during early ontogeny. *J. Fish. Biol.* 55: 596–616.
- Gisbert, E., Williot, P. & Castello´-Orvay, F. (2000). Influence of egg size on growth and survival of early life stages of Siberian sturgeon (*Acipenser baeri*) under small scale hatchery conditions. *Aquaculture* 183, 83–94.
- Gisbert, E. & Williot, P. (2002). Duration of synchronous egg cleavage cycles at different temperatures in Siberian sturgeon (*Acipenser baeri*). *J. Appl. Ichthyol.* 18, 271–274.
- Gisbert, E. & Doroshov, S.I. (2003). Histology of the developing digestive system and the effect of food deprivation in larval green sturgeon (*Acipenser medirostris*) *Aquat. Living Res.* 16: 77-89
- Goldan, O., Popper, D., Karplus, I., (1997). Management of size variation in juvenile gilthead sea bream (*Sparus aurata*): particle size and frequency of feeding dry and live food. *Aquaculture* 152, 181 - 190.
- Golowatschoff, A. (1857). Notice sur quelques espèces de poissons du genre *Acipenser*. *Bull. Soc. Nat. Moscú* 30: 530 – 543.
- Gómez, A., Duran, E., Ocaña, F.M., Jiménez-Moya, J., Broglio, C., Domezain, A., Salas, C. & Rodríguez, F. (2008). Observations on the Brain Development of the Sturgeon. 155 – 174 pp. In: Carmona, R., Domezain, A., García-Gallego, M., Hernando, J.A., Rodríguez, F. & Ruiz-Rejon, M. (eds). *Biology, Conservation and Sustainable development in Southern Europe*. Springer 470 pp.
- Gonçalves, B. C. (1942). Coleção oceanográfica de D. Carlos I. Peixes Trav. Stat. *Biol. Mar.* Lisboa, 46: 1 – 108.
- Goncharov, B.F. (1969a). Inhibitory effect of hypophysis on progesterone-induced oocyte maturation *in vitro* in frogs and sturgeon. In: *Demonstrations Presented at the 9th Internat. Embryological Conf.*, Nauka, Moscow. pp. 31- 32.
- Goncharov, B.F. (1969b). On the regularities of emergence of gonad sensitivity to the pituitary gonadotropic hormones. In: *A contemporary method of pituitary injections*. *Astrakhan*, pp. 39 – 44 (in Russian).
- Goncharov, B. F. (1972). Estimation of gonadotropic activity of sturgeon pituitary according to the reaction of *in vitro* oocyte maturation. 257 – 262 pp. In: Marti Yu Yu, Barannikova, I.A. (eds) *Sturgeons and the problems of sturgeon culture*. Pishchevaya Promyshlennost', Moscú (in Russian).

- Goncharov, B. F. (1976). The physiological condition of the elder generation of the stellate sturgeon follicles during spawning migration. 139 – 140. In: *Abstracts III All-Union Conf on Ecological physiology of fishes. Naukova Dumka, Kiev*, pt 2, pp 139 – 140 (in Russian).
- Goncharov, B. F. (1978). Influence of the composition of culture medium on the capacity of sturgeon follicles to respond to the effect of gonadotropic hormones by maturation. In: *Abstracts II All – Union Conf on the Problems of early ontogenesis of fishes. Naukova Dumka, Kiev*, pp 77 - 78 (in Russian).
- Goncharov, B.F., (2002). In vitro approach to studying the mechanisms of oocyte maturation in sturgeons: a review of fundamental and applied aspects. *J. Appl. Ichthyol.* 18(4-6): 386-374.
- Grandi, G. & Chicca, M. (2004). Early development of the pituitary gland in *Acipenser naccarii* (Chondrostei, Acipenseriformes): an immunocytochemical study. *Anat. Embryol.* 208: 311–321.
- Guenette, S., Rassart, E. & Fortin, F. (1992). Morphological differentiation of lake sturgeon (*Acipenser fulvescens*) from the St. Lawrence river and Lac Des Deux Montagnes (Quebec, Canada). *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, 49, 1959 – 1965.
- Guerrero, A. (2007) Desarrollo del corazón del esturión *Acipenser naccarii*. Tesis Doctoral, Universidad de Málaga. 189 pp.
- Haffter, P., Granato, M., Brand, M., Mullins, M.C., Hammerschmidt, M., Kane, D.A., Odenthal, J., van Eeden, F.J., Jiang, Y.J., Heisenberg, C.P., Kelsh, R.N., Furutani-Seiki, M., Vogelsang, E., Beuchle, D., Schach, U., Fabian, C., & Nusslein-Volhard, C. (1996). The identification of genes with unique and essential functions in the development of the zebrafish, *Danio rerio*. *Development* 123 (1): 1 - 36
- Hardy, R. & Litvak, M. (2004). Effects of temperatura on the early development, growth, and survival of shortnose sturgeon, *Acipenser brevirostrum*, and Atlantic sturgeon, *Acipenser oxyrinchus*, yolk – sac larvae. *Env. Biol. Fish.* 70: 145 – 154.
- Heckel, J. (1851). Die Störarten der Lagunen bei venedig. *Sitzungsber. Akad. Wissen. Wien* 6 (2): 547 – 563.
- Helling, H. (1943). Novo catalogo dos Peixes do Portugal em colecção no Museo de Zoología da Universidade de Coimbra. *Mem. Est. Mus. Zool. Univ. Coimbra.* 149: 1 – 110.
- Hendry, P.E., Hensleigh, J.E., Reisenbichler, R.R. (1998). Incubation temperature, developmental biology, and the divergence of sockeye salmon (*Oncorhynchus nerka*) within Lake Washington. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 55:1387 – 1394.
- Hernando, J.A., Ruiz-Rejón M., Soriguer M.C. & Domezain A. (1997). Actualización de la distribución histórica de *Huso huso* (L. 1758) y *Acipenser naccarii* Bonaparte 1836: nuevos casos de regresión. *II Congreso Ibérico de Biólogos Ambientalistas. Badajoz, España.*
- Hernando, J.A., Vasil'Eva, E. D., Alarti, J., Vasil'Ev, V. P., Santiago, J.A., Belysheva-Polyakova, L., Domezain, A., & Soriguer, M.C. (1999). New evidence for a wider historical area of

- two European sturgeons: *Acipenser naccarii* and *Huso huso* (Acipenseridae). *J. Appl. Ichthyol.* 39 (9): 803 – 806.
- Hernando, J.A., Alarti, G., Domezain, A., Soriguer, M.C. Poliakova-Belysceva, L.A., Domezain, J., Vallespín, C. & Bravo, R. (1999a). Morphometric study of *Acipenser naccarii* (Bonaparte, 1836) in fish faro individuals. *J. Appl. Ichthyol.* 15: 46 – 49.
- Hernando, J.A., Vasil'eva, E.D., Arlati, G., Vasil'ev, P.E., Santiago, J.A., Belysceva-Poliakova, L., Domezain, A., Soriguer, M.C. (1999b). A new proof for the historical presence of two European sturgeon in the Iberian Peninsula: *Huso huso* (L, 1758) and *Acipenser naccarii*, Bonaparte, 1836. *J. Appl. Ichthyol.* 15 (4 – 5): 280 – 281.
- Hernando, J.A., Domezain, J., Soriguer, M.C. y Domezain, A. (2001). Further morphological and genetic evidence that *Acipenser naccarii* is not endemic to the Adriatic but autochthonous to southern Europe. 4th *International Symposium of sturgeon, Oshkosh (USA)*.
- Hernando, J.A., Domezain, A., Zabala, C., Cabrera, R., Domezain, J. & Soriguer, M.C. (2008). The regression of sturgeon in southern Europe. 3-23 pp. In: Carmona, R., Domezain, A., García-Gallego, M., Hernando, J.A., Rodríguez, F. & Ruiz-Rejon, M. (eds). *Biology, Conservation and Sustainable development in Southern Europe*. Springer 470 pp.
- Huff, J. A. 1975. *Life history of Gulf of Mexico sturgeon, Acipenser oxyrinchus desotoi, in Suwannee River, Florida*. Florida Department of Natural Resources Marine Research Laboratory, Contribution No. 261: 32 pp.
- Holcik, J. (ed). (1989). *The freshwater fishes of Europe*. Aula-Verlag, Wiesbaden, 1/II. 469 pp.
- Holcik, J., Kinzelback, R., Sokolov, LL. & V.P. Vasilev. 1989. *Acipenser sturio*, Linnaeus, 1758: In: Holcik, J (ed). *The freshwater fishes of Europe*. Aula – Verlag, Wiesbaden, pp 367 – 394.
- Holcik, J., Banarescu, P. & Evans, D. (1989a). A General Introduction to Fishes. In: *The Freshwater Fishes of Europe, Vol. 1, Part II, General Introduction to Fishes, Acipenseriformes*, Holcik, J. (), AULA-Verlag, Wiesbaden , pp.: 18–147.
- Holcik, J., Kinzelbach, R., Sokolov, L.I. & Vasil'ev, V.P. (1989b). *Acipenser sturio* Linnaeus, 1758. In: *The Freshwater Fishes of Europe, Vol. 1, Part II, General Introduction to Fishes, Acipenseriformes*, Holcik, J. (), AULA-Verlag, Wiesbaden, pp.: 367–394.
- Icardo, J.M., Guerrero, A., Durán, A. C., Gallego, A., Domezain, A., Colvée, E. & Sans – Coma, V. (2004). The development of the sturgeon heart. *Anat. Embryol.* 208: 439 – 449.
- Ignatieva, G.M. (1957a). A morphophysiological study of the hatching gland in the giant sturgeon – *Huso huso* (L.). *Dolk Akad Nauk SSSR* 114: 1132 – 1135.
- Ignatieva, G.M. (1958). On conditions of synchronous hatching during incubation of sturgeon egg. *Rybn Khoz* (3): 20 – 25.
- Ignatieva, G.M. (1960). The regional nature of the inductive action of chordamesoderm in embryos of acipenserid fish. (In Russian.) *Dokl. Acad. Nauk SSSR* 134: 233- 236.

- Ignatieva, G.M. (1961). Inductive properties of the chordamesodermal rudiment prior to invagination and the regulation of its defects in sturgeon embryos. (In Russian.) *Dokl. Akad. Nauk SSSR* 139: 503 - 505.
- Ignatieva, G.M. (1963). A comparison of the dynamics of invagination of chordamesoderm material in embryos of *Acipenser stellatus*, *A. güldenstädti*, and axolotl. (In Russian.) *Dokl. Akad. Nauk SSSR*. 151:1466 - 1469.
- Ignatieva, G.M. (1965). Relationship between epibole and invagination in sturgeon embryos during the period of gastrulation. *Proc. Acad. Sci. USSR - Biol. Sect.* 165: 970 - 973.
- Ignatieva, G.M. (1979). Early development of fishes and amphibians. *Nauka Publishers*, Moscow (in Russian).
- Inouye, M. (1976). Differential staining of cartilage and bone in fetal mouse skeleton by alcian blue and alizarin red. *S. Congen. Anom.* 16: 171 - 173.
- Igumnova, L.V. (1974). A characteristic of the duration of maturation of the giant sturgeon (*Huso huso*) females after pituitary injection at different temperatures. *Vopr. Ikhtiol.* 14: 1029 - 1033 (in Russian).
- Igumnova, L.V. (1975a). Cronological patterns of embryonic development of the beluga. *Sov. J. Dev. Biol.* 6: 38 - 43 (in Russian).
- Igumnova, L.V. (1975b). Instruction for biotechnics of hatchery reproduction of the giant sturgeon. Glavrybvod, Moscow (in Russian).
- Igumnova, L.V. (1979). Temporal patterns of maturation and embryogenesis of the giant sturgeon with referente to the improvement of biotechnics of its breeding. Author's Abstract of the Candidate Dissertation. Inst Biol Rasv Acad Nauk SSSR, Moscow (in Russian).
- Igumnova, L.V. (1985a). Temporal patterns of embryogenesis in the sterlet. *Ontogenez* 16: 67 - 73.
- Igumnova, L.V. (1985b). Effects of temperatura drops on embryogenesis of *Huso huso* (L.) and *Acipenser stellatus* Pallas (Acipenseridae). *Vopr. Ikhtiol.* 25: 478 - 482. (in Russian).
- Igumnova, L.V. & Dubinin, V. I. (1987). Effects of gradients and short-term depressions of temperature during embryonic development of beluga, *Huso huso*, on the structure and survival rate of the prolarvae. *J. Ichthyol.* 27: 167-170.
- Ivanovic, B. M., (1973). Ichthyofauna of Skadar Lake. Biological Station, Titograd.
- Johston, I.A. & McLay, H.A. (1999). Temperature and family effects on muscle cellularity at hatch and first feeding in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Can. J. Zool.* 75, 64 - 74.
- Kamaci, O.K., Saka, S., Firat, K. (2005). The cleavage and embryonic phase of gilthead sea bream (*Sparus aurata* Linnaeus, 1758). *Eggs. E. U. J. Fisheries & Aquatic Sci.*, Vol. 22, Issue (1-2): 205-209.
- Kamler, E. (1992). Early life history of fish: an energetics approach. Chapman and Hall, London.

- Kandri, S., Metcalfe, N.B., Huntingford, F.A., Thorpe, J.E. (1997). Daily feeding rhythms in Atlantic Salmon II: size-related variation in feeding patterns of post-smolts under constant environmental conditions, *J. Fish. Biol.* 50, 273 – 279.
- Kazanskii, B. N. (1951). New data about introduction on the Russian and stellate sturgeons of the Kura river in culture. *Rybn Khoz* 27 (1): 31 – 36.
- Kazanskii, B. N. (1952). Completion of ovulation outside the female body in sturgeons. *Dokl Akad Nauk SSSR* 83: 965 - 968.
- Kazanskii, B. N. (1953a). On maturation and fertilization of the Russian sturgeon eggs. *Dokl Akad Nauk SSSR* 89: 757 - 760.
- Kazanskii, B. N. (1953b). Reproduction and breeding of the Kura river sturgeon in autumn. *Dokl Akad Nauk SSSR* 89: 957 – 960.
- Kempinger, J.J. 1988. Spawning and early life history of lake sturgeon in the Lake Winnebago system, Wisconsin. *Am. Fish. Soc. Symp.* 5: 110-122.
- Kiernan, J.A. (1990). *Histological & Histochemical Methods: Theory and Practice*. 170 – 197. 2nd ed. Pergamon Press. Oxford.
- Kimmel, C. A. & Trammell, C. (1981). A rapid procedure for routine double staining of cartilage and bone in fetal and adult animals. *Stain Technol.* 56: 271 – 273.
- Klymkowsky, M. W. & Hanken, J. (1991). Whole mount staining of *Xenopus* and other vertebrates. *Methods Cell Biol.* 36: 419 – 441.
- Koumoundouros, G., Cataudella, S. & Kentouri, M. (1997). Normal and abnormal osteological development of caudal fin in *Sparus aurata* L. fry. *Aquaculture* 149: 215 – 226.
- Kowalewsky, A., Owsjannikow, Ph. & Wagner, N. (1870). Die Entwicklungsgeschichte der Störe. *Vorläufige Mitteilung. Bull. Acad Sci St Petersburg* 14: 317 – 325.
- Krieger, J., Fuerst, P.-A. & Cavender, T. M. (2000). Phylogenetic relationships of the North American Sturgeons (Order Acipenseriformes) based on Mitochondrial DNA sequences. *Molec. Phylog. Evolut.* 16 (1): 64 – 72.
- Leung, T.C. & Wourms, J.P. (1991). Gastrulation of the paddlefish, Polyodon. *Amer. Zool.* 31 (5): 81 – 87.
- Llorente, J.I. (2006). Análisis Histo – Enzimático en el digestivo de *A. naccarii*, Bonaparte (1836): Evolución durante la ontogenia. Tesis Doctoral. Universidad de Granada. 290 pp.
- Loy, J.A., Bronzi, P. & S. Molteni. (1999). Geometric morphometrics in the characterisation of the craneal pattern of Adriatic sturgeon *Acipenser naccarii*. *J. Appl. Ichthyol.* 15, 50 -53.
- Ludwig, A., Belfiore N.M, Pitra C, Svirsky, V. & Jenneckens, I. (2001). Genome duplication events and functional reduction of ploidy levels in sturgeon (*Acipenser*, *Huso* and *Scaphirhynchus*). *Genetics* 158: 1203–1215.

- Machado, A. (1857). Catálogo de los peces que habitan o frecuentan las costas de Cádiz y Huelva con inclusión de los del río Guadalquivir. Sevilla. Azotea. N° 8 (1991): 59 – 87.
- McManus J.F. & Mowry R. W. (1948). Histological and histochemical uses of periodic acid. *Stain Technol.*, 23: 99.
- Magnin, E. (1959a) Repartition actuelle des Acipenseridés. *Rev. Trav. Pêches Marit.* 23 : 277 – 280.
- Marcus, L. F., Corti, M., Loy, A., Naylor, G.J.P. & Slice, D. E. (1996). Advances in morphometrics. *N.A.T.O. ASI Series, Plenum Press.*
- Marino, G., Boglione, C., Bertolini, B., Rossi, A., Ferreri, F. and Cataudella, S. (1993). Observations on development and anomalies in the appendicular skeleton of seabass, *Dicentrarchus labrax* L. 1758, larvae and juveniles. *Aquacult. Fish. Manag.* 24: 445 – 456.
- Martínez – Álvarez, R. M., Hidalgo, M.C., Domezain, A., Morales, A. E., García – Gallego, M. & Sanz, A. (2002). Physiological changes of sturgeon *Acipenser naccarii* caused by increasing environmental salinity. *J. Exp. Biol.* 205: 3699 – 3706.
- Martinez, G. M. & Bolker, J.A. Embryonic and larval staging of summer flounder (*Paralichthys dentatus*). *J. Morphol.* 255: 162-176.
- Martinez, S., Tomás, A., Pérez, L. Jover, M. (2003) Alternativas de diseño de una granja de truchas: volumen de producción y número de lotes anuales con dos perfiles de temperaturas. *Revista AquaTIC, nº 19, pp. 35 - 40.*
- Matsuoka, M. (1985). Osteological development in the red sea bream, *Pagrus major*. *Jpn. J. Ichthiol.* 32: 35 – 51.
- Maxime, V., Nonnotte, G., Peyraud, C., Williot, P. & Truchot, J. P. (1995). Circulatory and respiratory effects of and hypoxic stress in the Siberian sturgeon. *Respir. Physiol.* 100: 203 – 212.
- McCabe, G. T. & Tracy, C. A., (1994). Spawning and early life history of white sturgeon *Acipenser transmontanus* in the lower Columbia River. *Fish. Bull.* 92, 760–772.
- Mckenzie, D. J. (2001). Effects of dietary fatty acids on the respiratory and cardiovascular physiology of fish. *Comp. Biochem. Physiol.* 128: 607 – 621.
- Mckenzie, D. J., Taylor, E.W., Bronzi, P. & Bolis, C.L. (1995). Aspects of cardioventilatory control in the Adriatic sturgeon (*Acipenser naccarii*). *Respir. Physiol.* 100: 45 – 53.
- Metscher, B. D. & Ahlberg, P. E. (1999). Review: zebrafish in context: uses of a laboratory model in comparative studies. *Developmental Biology* 210, 1 – 14.
- Naccari, F. L. (1822). Ittiologia Adriática, ossi Catalogo de'Pesci del Golfo e Lagune di Venecia. *Giorn. Física Nat. Pavia, Decade II*, 5: 327 – 340; 409 – 418.
- Nardo, G. D. (1827). Prodromus observationum et disquisitionum Adriaticae Ichthyologiae. *Giorn. Física Nat. Pavia* 10: 22 – 40.

- Nathanailides, C., Tsoumani, M., Papazoglou, A., & Paschos, I. (2002). Hatching time and post-hatch growth in Russian sturgeon *Acipenser gueldenstaedtii*. *J. Appl. Ichthyol.* 18, 651–654.
- Nikol'skaya, N.G. & Sytina, L.A. (1978). A comparative analysis of the action of constant temperatures on the embryonic development of four species of sturgeons. *J. Ichthyol.* 18 (1): 86 – 100.
- Nobre, A. (1931). Peixes das águas doces de Portugal. *Bol. Min. Agric.*, 13 (2): 73 – 112.
- Nobre, A. (1935). *Fauna Marinha de Portugal*. Vertebrados. Porto., 579 pp.
- North, J.A., Farr, R. A. & Vescei, P. (2002). A comparison of meristic and morphometric characters of green sturgeon *Acipenser medirostris*. *J. Appl. Ichthyol.* 18, 234 – 239.
- Ojeda, J. L., Icardo, J. M. & Domezain, A. (2003). Renal corpuscle of the sturgeon kidney: an ultrastructural, chemical dissection, and lectin – binding study. *Anat. Rec.* 272: 563 – 573.
- Osorio, B. (1894). D'algumas especies a juntar ao Catalogo dos peixes do Portugal de Capello. *Journ. Sc. Math phys Nat.*, 3 (11): 186 – 188.
- Paccagnella, B. (1948). Osservazioni sulla biologia degli storioni del Bacino Padano. *Arch. Oceanogr. Limnol.* 5: 141–154.
- Parenti, L. R. (1986). The phylogenetic significance of bone types in euthleost fishes. *Zool. J. Linn. Soc.* 87 (1): 37 – 51.
- Pearse, A. G. E. (1985). Histochemistry: Theoretical and Appl. Vol 2: 441 – 1055. In: *Analytical Technology*. 4th ed., Churchill – Livingstone, Edinburgh.
- Perrin, C. J., Rempel, L. L. & Rosenau, M. L. (2003). White sturgeon spawning habitat in an unregulated river: Fraser River, Canada. *Trans. Am. Fish. Soc.* 132, 154–165.
- Persov, G. M. (1941). An account of sturgeon culture work with reference to the use of the method of pituitary injections. Pages 42–50 in N. L. Gerbil'skii, editor. *The method of pituitary injections and its role in reproduction of fish resources*. LGU Press, Leningrad. (en ruso; citado de (Dettlaff et al. 1993.)
- Poljakov, G. D., Filipi, N.D. Kozma B., & Hysenaj, A. (1958). Peshqit e Shqipërisë. Universiteti Shtetëror i Tiranës, Tiranë, 1958.
- Poole, T.J. (1988). Cell rearrangement and directional migration in pronephric duct development. *Scanning Microscopy*. 2: 411 - 415.
- Raventós, N. & MacPherson, E. (2001). Plantonik larval duration and settlement marks on the otoliths of Mediterranean littoral fishes. *Mar. Biol.* 138: 1115 – 1120.
- Richard, E., Castelnaud, G. & Lepage, M. (1990). Sturgeon (Pisces: Acipenseridae); threats and prospects. *J. Fish. Biol.* 37A, 123 – 132.

- Richardson, M.K. & Wright, G. M. 2003. Developmental transformations in a normal series of embryos of the sea lamprey *Petromyzon marinus* (Linnaeus). *J. Morphol.* 257: 348 – 363.
- Robles, F. (2003). Análisis de la evolución concertada, filogenia e identificación de especímenes en el Orden Acipenseriformes. Tesis Doctoral. Universidad de Granada.
- Robles, F., De la Herrán, R., Ludwig, A. Ruiz Rejón, C., Ruíz Rejón M. & Garrido – Ramos, M.A. (2004). Evolution of ancient satellite DNAs in sturgeon genomes. *Gene* 338: 133 – 142.
- Romer, A.S. & Parsons (1981). Anatomía Comparada. Nueva Editorial Interamericana.. 428 pp.
- Rohlf, F. J. & Marcus, L.F. (1993). A revolution in morphometrics. *Tree*, 8, 129 – 132.
- Ryder, J.A. (1888). The sturgeons and sturgeon industries of the eastern coast of the United States, with an account of experiments bearing upon sturgeon culture. *Bull. U.S. Fish Comm.* 8: 231 - 324.
- Ruban, G. I. (1989). Clinal variation of morphological characters in the siberian sturgeon, *Acipenser baeri* of de Lena basin. *J. Ichthyol.*, 29, 48-55.
- Ruban, G. I. & Panaiotidi, A. I. (1994). A comparative morphological analysis of subspecies of the siberian sturgeon *Acipenser baeri stenorrhynchus* and *A. baeri chatys* (Acipenseridae) of the Yenisey and the Lena rivers. *J. Ichthyol.*, 34, 58-71
- Ruban, G. I. & Sokolov, L.I. (1986). Morphological variability of siberian sturgeon, *Acipenser baeri*, in the Lena river in relation with its culture in warm water. *J. Ichthyol.*, 26, 88-91.
- Sadov, I.A. & Kokhanskaya, E. M. (1961). Incubation of sturgeon eggs in thoughts. *Tr Inst Morpol. Zhivot Akad Nauk SSSR* 37: 5 – 66.
- Salensky, V.V. (1878). Developmental history of the starlet (*Acipenser ruthenus*). 1. Embryogenesis. *Tr Ova Estestvoispytatelei pri Kazanskom Univ* 7 (3): 1 – 226.
- Salensky, V.V. (1880). Developmental history of the starlet (*Acipenser ruthenus*). 2. Postembryonic development and development of organs. *Tr Ova Estestvoispytatelei pri Kazanskom Univ.* 10 (2): 226 – 545.
- Salensky, V.V. (1881). Recherches sur le développement du sterlet, *Acipenser ruthenus*. *Arch Biol* 2 : 233 – 241.
- Schmalhausen, O.I. (1968). Development of the digestive system in Acipenserid fishes. 40 – 70. In: Disler N.N. (ed) *Morphoecological studies of fish development*. Nauka, Moscow, (en ruso).
- Schmalhausen, O.I. (1975). The Russian sturgeon *Acipenser gueldenstaedti*. Development of prelarvae. 264 – 277. In Dettlaff, T.A. (ed) *Objects of developmental biology*. Nauka, Moscow, (en ruso).
- Schmalhausen, O.I. (1991). The Russian sturgeon *Acipenser gueldenstädti*. Part II. Later prelarval development. Ch. 3. 67 - 88. In: *Animal species for developmental studies. Vol. 2. Vertebrates*. Edited by T.A. Dettlaff & S.G. Vassetzky. Consultants Bureau, New York and London.

- Shagaeva, V.G., Nikol'skaya, M.P., Akimova, N.P., Markov, K.P. & Nikol'skaya, N.G. (1993). A study of the early ontogeny of Volga sturgeon (*Acipenseridae*) subjected to human activity. *J. Ichthyol.* 33: 23 - 41.
- Shelton, W.L., Mims, S.D., Clark, J.A., Hiott, A.E., & Wang, C. (1997). A temperature-dependent index of mitotic interval (τ_0) for chromosome manipulation in paddlefish and shovelnose sturgeon. *Progressive Fish-Culturist* 59:229-234.
- Skoblina, M.N. (1968). Maturation of the cortex of enucleated oocytes of frog and stellate sturgeon induced by gonadotropic pituitary hormones. *Dokl Akad Nauk SSSR* 183: 643 - 645.
- Skoblina, M.N. (1969). Independence of the cortex maturation from germinal vesicle material during the maturation of amphibian and sturgeon oocytes. *Exp. Cell. Res.* 55: 142 -144.
- Seabra, A. F. (1911). Catalogue systématique des vertébrés du Portugal. V. Poissons. *Bull. Soc. Port. Sc. Nav.*, 5 : 129 - 224.
- Snyder, D.E. (2002). Pallid and shovelnose sturgeon larvae-morphological description and identification. *J. Appl. Ichthyol.* 18, 240 - 265.
- Sokolov, V.E. (1989). Dictionary of animal names in five languages. Fishes. Russky Yazyk Publishers, Moscow. 733 p.
- Sokolov, L. I., Koshelev, B. V., Khalatyan, O.V., Ruban, G.I., Akimova, N.V. & Sokolova, E. L., (1986). Ecologo-morphological characteristics of Siberian sturgeon *Acipenser baeri* Brandt from the Aldan river. *Vopr. Ikhtiol.*, 26, 741 - 749.
- Soljan, T. (1975). Il pesci dell'Adriatico. Mondori, Verona. 522 pp.
- Song, J. & Parenti, L. R. (1995). Clearing and staining whole fish and other vertebrates for bone and cartilage study. *Cybium* 9: 107 - 119.
- Soriguer, M.C. (1996). Ciclos de vida y ecología trófica de la ictiofauna del río Palancar (tierras subbéticas de Córdoba). Tesis Doctoral. Universidad de Córdoba. 332 pp.
- Soriguer, M.C., Domezain J., Domezain A., Bernal M., Esteban C., Pumar J.C. & Hernando J.A. (1999). An approximation of the feeding habits of *Acipenser naccarii* Bonaparte 1836 using an artificial river. *J. Appl. Ichthyol.* 15 (4 - 5): 348.
- Soriguer, M.C., Bravo, R., Vallespín, C., Gomez-Cama, C. & Hernando, J.A. (2000). Reproductives estrategias of two species of cyprinids in a stream with mediterranea regimen (SW Spain). *Archiv. Für Hydrobiologie* 148 (1): 119 - 134.
- Soriguer, M.C., Domezain A., Aragonés J., Domezain J. & Hernando, J.A. (2002). Trials of feeding preference in juveniles of *Acipenser naccarii* Bonaparte 1836 using an artificial river. *J. Appl. Ichthyol.* 18: 691-695.
- Soriguer M.C., Domezain J., Domezain A. & Hernando J.A. (2005). La dieta de *Acipenser naccarii* Bonaparte 1836 en un mesocosmos cerrado. *Actas IX Congreso Nac. Acuicultura.* Cádiz. España: 79 - 81.

- Stefansson, M.O., Imsland, A. K., Jenssen, M.D., Jonassen, Y. M-, Stefansson, S. O. Fitzgerald, R., (2000). The effect of different initial size distributions on the growth of Atlantic halibut. *J.Fish. Biol.* 56, 826 – 836.
- Svetovidov, A.N. (1984). Acipenseridae. pp. 220–225. In: *Fishes of the North-eastern Atlantic and the Mediterranean*. Whitehead, R.J.P., Bauchot, M.C., Hureau, J.C., Nielsen, J., Tortonese E. (eds). UNESCO. Paris. Vol 2.
- Sytina, L.A. & Shagaeva, V.G. (1987). Thermotolerance of progeny of sevruga, *Acipenser stellatus*, spawners from different periods of the spawning migration. *J. Ichthyol.* 27: 12-21
- Swain, D.P. & Foote, C. J. (1999). Stocks and chameleons: the use of phenotypic variation in the stock identification. *Fisheries Research* 43: 113-128.
- Taler, Z. (1954). Rasprostranjenje i popis slatkovodnih riba Jugoslavije. *Glasnik Priro. Muž. Srpske zem.*, ser. B, vol. 5 – 6.
- Talman, R. F. (1986). Genetic differentiation among seasonally distinct spawning populations of chum salmon, *Oncorhynchus keta*. *Aquaculture* 57, 211–217.
- Taylor, W. R. & Van Dyke, G. C. (1985) Revised procedures for staining whole fish specimens for simultaneous demonstration of bone, cartilage and nerves. *Copeia* 1: 114 – 119.
- Tortonese, E. (1989) *Acipenser naccarii* Bonaparte, 1836. In: *The freshwater fishes of Europe*, Holcik, J., Ed., Wiesbaden: Aula – Verlag, Wiesbaden, pp. 285 – 293.
- Umino, T., Arai, K., Nakagawa, H. (1997). Growth performance in clonal crucian carp *Carassius langsdorfi*. Effect of genetic difference and feeding history. *Aquaculture* 155, 275 – 287.
- Van Eenennaam, J.P., Linares-Casenave, J., Deng, X. & Doroshov, S. I. (2005). Effect of incubation temperature on green sturgeon embryos, *Acipenser medirostris*. *Env. Biol. Fish.* 72: 145–154.
- Van Eenennaam, A.L., Van Eenennaam, J.P., Medrano, J.F., & Doroshov, S.I. (1996). Rapid verification of meiotic gynogenesis and polyploidy in white sturgeon (*A. transmontanus*, Ridcharson). *Aquaculture* 147: 177-189.
- Van Eenennaam, J.P., Webb, M.A.H., Deng, X., Doroshov, S.I., Mayfield, R.B., Cech, J.J. Jr., Hillemeier, D.C. & Wilson, T.E. (2001). Artificial spawning and larval rearing of Klamath River green sturgeon. *Trans. Amer. Fish. Soc.* 130:159-165.
- Vázquez, M., F. Rodríguez, F., Domezain, A. & Salas, C. (2002). Development of the brain of the sturgeon *Acipenser naccarii*. *J. Appl. Ichthyol.* 18: 275–279.
- Vlasenko A. D., Pavlov, A. V., Sokolov, L. I. & V.P. Vasil'ev (1989a). *Acipenser gueldenstaedti* Brandt, 1833. In: Holcik, The freshwater fishes of Europe, vol. 1, (Pt.2). Aula – Verlag, Wiesbaden, pp. 294 – 344.
- Vernidub, M.F. (1951). Morphophysiological stages in development of Acipenserid eggs and larvae and their importance for fish culture. *Uch Zap LGU* 142 Ser. Biol. Nauk 29: 75-106.

- Vernidub, M.F. (1952). Instruction for determining the hatchery quality, obtaining, fertilizing, rational, demucilaging and incubating eggs and rearing larvae of *Acipenser fishes*. Biological Foundation for Line II of Sturgeon Hatchery (en ruso).
- Vernidub, MF & Kiseleva, E.V. (1953). Influence of “overmaturation” on the pattern of initial cleavage in the Acipenserid eggs and their mortality at the early developmental stages. *Dokl Akad Nauk SSSR* 92: 1093-1095.
- Von Baer, K. E. (1828). *Über Entwicklungsgeschichte der Thiere: Beobachtung und Reflexion*. Vol. 1. Borntrager, Königsberg, Russia.
- Vorob'eva, E.I. Rubtsov, V.V. & Markov, K.P. (1986). Influence of environmental factors on the microstructure of egg membranes in fishes. *Nauka*, Moscow.
- Votinov, NP. (1947). The ovary of the stellate sturgeon during the spawning migration, spawning and downstream migration. *Tr Lab Osnov Rybovod* 1: 139 – 154.
- Wang, Y.L., Binkowski, F.B. & Doroshov, S.I. (1985). Effects of temperatura on early development of white and lake esturgeon *Acipenser transmontanus* and *A. fulvescens*. *Env. Biol. Fish.* 14(1): 43 - 50.
- Wang, Y.L., Buddington, R.K. & Doroshov, S. I. (1987). Influence of temperature on yolk utilization by white sturgeon, *A. transmontanus*. *J. Fish. Biol.* 30 (3): 263 – 267.
- Wasserburg, R. I. (1976). A procedure for differential staining of cartilage and bone in whole formalinixed vertebrates. *Stain Technol.* 51: 131 – 134.
- Webb, G.N. & Byrd, R. A. (1994). Simultaneous differential staining of cartilage and bone in rodent fetuses: an alcian blue and alizarin red S procedure without glacial acetic acid. *Biotechnic & Histochem.* 69: 181 – 185.
- Williot, P. (1989). L'élevage des sturgeons. In *Aquaculture* (Barnabe, G. ed.), pp.776–802. Paris: Technique et Documentation Lavoisier.
- Wooley, C.M. & Crateau, E.J. (1985). Movement, microhabitat, exploitation, and management of Gulf of Mexico sturgeon, Apalachicola River, Florida. *North Amer. J. Fish. Manage.* 5: 590–605.
- Yamagami, K. (1973). Some enzymological properties of a hatching enzyme (chorionase) isolated from the fresh-water teleost, *Oryzias latipes*. *Comp. Biochem. Physiol.* 46(3): 603-16.
- Yamagami, K. (1981). Mechanisms of Hatching in Fish: Secretion of Hatching Enzyme and Enzymatic Choriolysis. *Am. Zool.* 21(2): 459 – 471.
- Yamagami, K. (1996). Studies on the Hatching Enzyme (Choriolysin) and Its Substrate, Egg Envelope, Constructed of the Precursors (Choriogenins) in *Oryzias latipes*: A Sequel to the Information in 1991/1992. *Zool. Sci.* 13 (3): 331 – 340.
- Yasumasu, S., Iuchi, I. & Yamagami, K. (1989). Purification and Partial Characterization of High Choriolytic Enzyme (HCE), a Component of the Hatching Enzyme of the Teleost, *Oryzias latipes*. *J. Biochem.* 105 (2): 204 -211.

-
- Yasumasu, S., Iuchi, I. & Yamagami, K. (1994). cDNAs and the Genes of HCE and LCE, Two Constituents of the Medaka Hatching Enzyme. *Develop. Growth & Differ.*, 36 (3), 241-250.
- Yasumasu, S., Shimada, H., Inohaya, K., Yamazaki, K., Iuchi, I., Yasumasu, I. & Yamagami, K. (1996). Different exon-intron organizations of the genes for two astacin-like proteases, high choriolytic enzyme (choriolysin H) and low choriolytic enzyme (choriolysin L), the constituents of the fish hatching enzyme. *Eur. J. Biochem.* 237, 752-758.
- Yasumasu, S. & Yamagami, K. (2004). Choriolysin H. In: *Handbook of Proteolytic Enzymes*, 625-627 pp. 2 edn (Barret, A.J., Rawlings, N.D. & Woessner, J.F. Eds), Elsevier, London.
- Zeiske, E., Kasumyan, A., Bartsch, P. & Hansen, A. (2003). Early development of the olfactory organ in sturgeons of the genus *Acipenser*: a comparative and electron microscopic study. *Anat. Embryol.* 206: 357–372.
- Zotin, A.I. (1953b). Hatching enzyme in sturgeon embryos. *Dokl Akad Nauk SSSR* 92: 685 – 687.

Relación de Figuras, Tablas y Láminas

Figuras

Figura 1. Representación de las 5 líneas que constituyen el grupo de los Actinoptergios, (adaptada de Bemis et al., (1997); Billard, R. (2002)).....	13
Figura 2. Árbol filogenético consensuado mostrando las relaciones entre los Acipenseriformes. (Según Bemis & Kinard (1997a) y Krieger et al., (2000)).....	16
Figura 3. Distribución antigua de <i>A. naccarii</i> de acuerdo a Bonaparte, 1836.....	19
Figuras 4. y 5. Distribución histórica de <i>A. naccarii</i> . Regresión y recolonización por restauración del stock.....	20
Figura 6. Localización del lugar de muestreo para huevos, embriones y alevines.....	31
Figura 7. Proceso general de toma de muestras.....	33
Figura 8. Medidas realizadas en la cabeza de <i>A. naccarii</i>	35
Figura 9. Medias que se realizan sobre la aleta caudal.....	35
Figura 10. Medias que se realizan sobre el saco vitelínico.....	35
Figura 11. Medias que se realizan sobre las aletas pectorales.....	35
Figura 12. Huevos no fecundados dentro de la hembra. Apariencia de los huevos granulosa y de color gris oscuro.....	48
Figura 13. Estadio 2. Huevo a los 20' de ser fecundado (post-fecundación (pf)) Vemos la apariencia externa del huevo después de la fecundación, donde se ha segregado el coloide hidrófilo, (JC). 1. Vista lateral (polo animal (PA) y polo vegetativo (PV)) y 2. Vista desde el polo animal. (LPS): punto polar claro, 16X.....	49
Figura 14. Huevo en la etapa de "luna creciente", LC, correspondiente al Estadio 3, formada a 1 h 20' pf, a 17 ° C. Puede apreciarse la acumulación de pigmentos en los alrededores de la región animal, 25X.....	51
Figura 15. a. Estadio 4. Huevo 1h 40' post-fecundación (pf), inicio de la primera división, donde se puede observar el primer surco (F1) en la superficie del polo animal y la luna creciente (LC). b. Formación de dos blastómeros de igual área, 2h 20', tras la fecundación equivalente al Estadio 4+, 25X.....	51
Figura 16. a. Estadio 4+. Comienzo de la segunda división, F ₂ , 2h 20' pf, 25X.....	51
Figura 17. Huevo poliespérmico a las 3 horas (pf), la división resulta asincrónica, tres blastómeros. Podemos observar el coloide hidrófilo (JC) y la zona radiada (ZR), 25X.....	51
Figura 18. Inicio de la cuarta división en el Estadio 6+ an, (vista del polo animal, an, entre estadios 6 y 7) a las 4h post-fecundación a 17°C; región animal dividida en 8 blastómeros, 25X.....	51
Figura 19. Huevo correspondiente al Estadio 9. Polo animal, a las 5h 40' (pf) se han diferenciado numerosos blastómeros (AB). Vista lateral, los surcos comienzan a dividir el polo vegetativo, aparecen blastómeros de diferentes tamaños (VB); Polo vegetativo: detalle de los blastómeros, 25X.....	53
Figura 20. a. Estadio 10. Estadio de blástula temprana vista desde el polo animal (an), a las 7h 40' pf. b y c. Correspondientes al Estadio 11 a partir de 10 hpf; b. lat, Vista lateral del huevo (zona de transición entre los dos polos); c. vista del polo animal con gran cantidad de blastómeros de más o menos el mismo tamaño, 25X.....	53
Figura 21. Estadio 12. Huevo mostrando un estado de blástula tardía. Se caracteriza porque los blastómeros del polo animal son mucho más pequeños. Vista polo animal (12 an), vista lateral (12 lat) y vista polo vegetativo (12 veg), 25X.....	53
Figura 22. Estadio 13. Inicio de la gastrulación, 16X.....	55
Figura 23. Estadio 14. Gastrulación temprana. Podemos observar el inicio del blastoporo, Bp. 25X.....	55
Figura 24. Estadio 15. Gastrulación media; 15 d, vista desde el lado dorsal; Bc, blastocelo; AF suelo pigmentado del arquenterón visto desde arriba del mismo sobre el lado dorsal, 15 veg., vista desde el polo vegetativo; (Bp), blastoporo, (YP), tapón de vitelo, 25X.....	55
Figura 25. Estadio 16 y Estadio 16 +. Vista del polo vegetativo (veg) donde puede apreciarse el blastoporo, (Bp) y el tapón de vitelo, (YP), 25X.....	55

- Figura 26. Estadio 17 y Estadio 17+.** Se reduce el tamaño del tapón de vitelo (**YP**), 25X 57
- Figura 27. Estadio 18,** etapa de gastrulación completa, donde se aprecia una pequeña hendidura correspondiente al cierre del blastoporo (**Bp**), 25X 57
- Figura 28. Estadio 18,** tapón de vitelo tardío (**YP**), con indicación del eje embrionario, 16X 57
- Figura 29. Estadio 19.** Neurulación temprana. Comienzan a formarse los pliegues neurales y puede apreciarse levemente pigmentado el surco neural, (**NG**). La parte más ancha (en el recuadro rojo), corresponde a la porción cefálica, 16X 57
- Figura 30. Estadio 20,** vista desde el lado dorsal (**20 d**). En esta región se puede apreciar el surco neural, (**NG**) la placa neural (**NP**) y cómo ésta amplía sus límites a los pliegues neurales (**NF**) en la región anterior, 25X 57
- Figura 31. Estadios 21d y 22 d,** donde se observan los pliegues neurales con su forma romboidal, 25X 59
- Figura 32. Estadio 23.** Etapa de tubo neural cerrado. Claramente perceptible el surco a lo largo de la línea de fusión de los pliegues neurales, (**Su**). **23 h**, vista desde el lado de la región cefálica y **23 d**, vista desde el lado dorsal, puede apreciarse la zona correspondiente al encéfalo rudimentario, (**Br**). **23 d** y **23 lat** (vista desde el lado lateral), puede distinguirse el rudimento del sistema excretor, (**Ex**), 16X 59
- Figura 33. Estadio 24. 24 h,** etapa donde se aprecian las protuberancias de los ojos (**ER**), los rudimentos del primer y segundo par de arcos viscerales, A_I y A_{II} , respectivamente. También se aprecian las regiones del prosencéfalo (**Pe**) y mesencéfalo (**Me**), 12.5X 59
- Figura 34. Estadio 24. 24 d,** vista desde el lado dorsal, se observan los rudimentos del sistema excretor (**Ex**) y en la cabeza, la región del rombencéfalo, (**Re**), 12.5X 61
- Figura 35.** Corresponde al **Estadio 26**. Se pueden diferenciar las distintas estructuras descritas en el texto. En **26 h** (vista desde el lado de la cabeza), vemos un detalle de ésta donde se aprecia en la parte posterior la zona con forma triangular, que aparece más oscura, que corresponde a la cavidad del mielencéfalo (**MyC**); el rudimento de la epifisis (**PR**), como una pequeña línea algo más pigmentada, la glándula de eclosión (**HG**) y lateralmente las zonas A_I y A_{II} , correspondientes a los rudimentos del primer y segundo arco visceral respectivamente; y en la parte anterior los rudimentos de los ojos (**ER**) como dos pequeños abultamientos. En vista ventral, **26 v**, podemos diferenciar claramente la cabeza de la cola (**T**). Aún se aprecia la zona del punto polar claro (**LPS**), 12.5X 61
- Figura 36. Estadio 27,** (vista desde la zona de la cabeza, **27h**) podemos observar la cabeza más definida. Se aprecia: la cavidad del mielencéfalo (**MyC**) como una forma triangular y más pigmentada; los rudimentos de los ojos aparecen como dos puntos algo más marcados (**ER**), la zona encuadrada en rojo representa el lugar de formación del rudimento de la pituitaria (**PR**) y justo por delante se encuentra la zona donde se está formando, como un tubo corto, el corazón (**Ht**). En la **27t** vemos un detalle de la cola y en **27d** (vista dorsal) se observa una elevación más marcada de la parte del tronco y se distingue el rudimento de uno de los ojos (**ER**), 25X 61
- Figura 37.** Muestra el **Estadios 25**. Detalle de la región caudal, **25 v** (vista ventral) y **25t** (vista desde la zona caudal). Las regiones posteriores (troncal y caudal) tienen forma de lóbulo amplio y aplanado 63
- Figura 38. Estadio 26** (vista lateral, **26 lat**) y vista desde la región caudal. En la parte superior derecha, **27t**, se aprecia que la separación de la cola de la superficie del saco vitelínico está más acentuada y la región posterior se ha elevado y ha tomado forma de barra. La flecha roja indica el punto oscuro que según Dettlaff et al., (1993) es la extensión de la cavidad estomacal hacia el final de la región caudal en la conexión de la cavidad del tubo neural, 25X 65
- Figura 39. Estadio 28** en vista ventral (**28v**) donde se aprecia el rudimento del corazón (**Ht**) como una zona alargada y más clara justo delante de la cabeza, así como la cola (**T**). **b. vista dorsal (28d)**, se observa la parte anterior de la cabeza y posteriormente la elevación de la zona del tronco. Detalle de la estructura de los conductos excretores a través de la cubierta epitelial; (**CD**) porción colectora del conducto excretor; (**PD**) conducto excretor; (**PT**) túbulos excretores; (**So**) somitos, 25X 65
- Figura 40.** Vista lateral de un embrión en el **Estadio 29**, donde se aprecia el ojo (**E**) y la curvatura de la cola. Nótese que en el plano más cercano al lector se encuentra la cabeza, mientras que la cola está en un segundo plano, 8X 67
- Figura 41. Estadio 29,** (vista desde la cabeza, **29 h**), el rudimento del corazón, tubo cardiaco, puede apreciarse de color más claro (**Ht**), además se diferencian en la cabeza los ojos (**E**) y el saco olfativo (**OS**) y también se distingue claramente la cola (**T**). En este mismo estadio, (vista dorsal, **29d**), podemos ver también los rudimentos de los túbulos excretores (**PT**), conducto excretor (**PD**) y la parte colectora del conducto excretor (**CD**), 12.5X 67

Figura 42. Estadio 30, (vista desde la cabeza, **30 h**), la cabeza tiene una forma más redondeada. En la vista dorsal, **30 d**, se observan los rudimentos de los túbulos excretores (**PT**), conducto excretor (**PD**) y la porción colectora del conducto excretor (**CD**) así como una curvatura más patente de la cola, 16X 67

Figura 43. Vista lateral de un embrión, en **Estadio 30** una vez que se han retirado las membranas. De la cabeza a la cola se diferencian, el ojo (**E**), la glándula de eclosión (**HG**) el conducto excretor (**PD**), el rudimento de la cloaca (**CR**) y el rudimento del pliegue de la aleta (**FF**), 12.5 X 69

Figura 44. Vista ventral de un embrión en el **Estadio 30 una vez que se han retirado las membranas**. donde destacamos (**Ht**), lugar de formación del corazón y un detalle de la zona caudal donde se aprecia la separación existente entre la cola y la superficie ventral del cuerpo, 20X..... 69

Figura 45. Embrión en **Estadio 30**, vista lateral (**30 lat**) donde se destaca el ojo (**E**) y vista desde el lado de la cola, (**30 t**) comienza a distinguirse el rudimento del pliegue de la aleta, (**FF**), 25X 69

Figura 46. Estadio 31, vista dorsal, **31 d**, embrión al que se le han retirado las membranas. En la zona de la cabeza destaca una marcada pigmentación en forma triangular, región del mielencéfalo (**MyC**) así como en la cola. Se destacan algunas estructuras como son la zona correspondiente a los túbulos excretores (**PT**), la zona correspondiente a la parte colectora del conducto excretor (**CD**) y el propio conducto excretor (**PD**), además del rudimento del pliegue de la aleta, (**FF**). La cola aparece más aplanada y rodeada por la "membrana aletil", 12.5X..... 71

Figura 47. Estadio 31, embriones en diferentes posiciones dentro de las membranas, (lateralmente, **31 lat**) donde se distinguen el ojo (**E**), el saco olfativo (**OS**) y más abajo la región donde se sitúa la glándula de eclosión (**HG**). El ojo (**E**) y el saco olfativo (**OS**) también pueden apreciarse en la vista ventral, (**31v**), donde la punta de la cola se aproxima a la zona del corazón. En **32d**, correspondiente a un embrión en el **Estadio 32**, a simple vista apreciamos los somitos (**So**) y la zona encuadrada en el rectángulo rojo muestra como la punta de la cola alcanza la cabeza, 20X..... 71

Figura 48. Vista lateral y dorsal de un embrión en **Estadio 32** al que se le han retirado las membranas. Se aprecia claramente el rudimento del pliegue de la membrana aletil (**FF**), los somitos (**So**) y en la zona de la cabeza la vesícula auditiva (**AV**), 12.5X..... 71

Figura 49. Embriones en **Estadio 33**, a partir de las 82 horas, la cola sobrepasa un poco la punta de la cabeza, 12.5 X..... 73

Figura 50. Embrión en Estadio 35, 16X 73

Figura 51. Embrión en **Estadio 36**. El ojo aparece bastante más pigmentado, se aprecia también la vesícula auditiva así como el color rojizo de la sangre en el corazón y los vasos del saco vitelínico, 16X 73

Figura 52. Embrión malformado. Aparece totalmente curvado con un desarrollo anormal de la membrana que lo envuelve impidiendo la separación entre el saco vitelínico y el tronco, 12.5X 73

Figura 53. Proceso de distensión de la membrana del huevo antes de la eclosión: **a.** huevo con sus envolturas visto con luz transmitida; **b.** huevo con abombamiento en la cubierta; **c. y d.** dos fases de la degradación de la cubierta, 12.5X..... 75

Figura 54. Embrión eclosionando por la parte de la cabeza, 8X..... 75

Figura 55. Rotura de la membrana por la cola, 12.5X..... 75

Figura 56. Embrión con restos de membrana justo después de la eclosión, 16X..... 75

Figura 57. Embrión de vida libre en **Estadio 36**, donde se aprecia claramente la cabeza más pequeña en relación al saco vitelínico bastante redondeado, más ancho en su parte anterior. La válvula espiral desemboca en el rudimento de la cloaca (**CR**) entre los pliegues preanal y postanal. El pliegue de la aleta (**FF**) (membrana aletil), bordea todo el embrión desde la parte posterior de la cabeza (**1**), muy reducido hasta el saco vitelínico (**2**) más ancho. La cola es protocerca (**T**) ya que la notocorda aparece recta y la anchura del pliegue tanto superior como inferior es la misma, 10X..... 93

Figura 58. Detalle zona anterior de un embrión de vida libre en el **Estadio 36**, donde puede apreciarse la glándula de eclosión (**HG**), y el primer indicio de formación de la aleta pectoral (**PF**), 8X..... 93

Figura 59. Embrión de vida libre en **Estadio 37**, donde se aprecia cómo la cabeza comienza a enderezarse, el saco vitelínico está menos redondeado y la cola se estiliza. En la parte ventral anterior destaca la presencia del "corazón" que aparece como una mancha traslúcida roja a la luz, 8X. 94

Figura 60. Detalle de la cabeza de un embrión en Estadio 37 , donde (b) muestra los primeros indicios de la formación de los rudimentos de las barbillas, (br) rudimento del surco branquial y (m) lugar de apertura de la boca, 40X.....	95
Figura 61. Detalle de la parte anterior de un embrión de vida libre en Estadio 37 donde se localiza (br) primer par de hendiduras branquiales (surco branquial) y (PF) la aleta pectoral, 32X.....	95
Figura 62. Detalle de la válvula espiral (SG) de un embrión de vida libre en Estadio 37 , 20X.....	95
Figura 63. Detalle de la zona caudal de un embrión de vida libre en Estadio 37 , donde se puede observar, enmarcado en blanco, el rudimento de la cloaca (CR) . También se aprecia la existencia de una leve pigmentación de la zona, 20X.....	95
Figura 64. Embrión de vida libre en Estadio 38 , donde se aprecia como la cabeza está más enderezada, el saco vitelínico presenta varias partes y ha aumentado la pigmentación en las regiones troncal y caudal, 10X.....	97
Figura 65. En la foto de la izquierda se puede apreciar la vista dorsal de la cabeza de un embrión de vida libre en Estadio 38 , se observa pigmentación aunque los melanocitos aparecen aún dispersos. En la foto de la derecha se muestra la vista ventral de la cabeza, se observan los filamentos branquiales (brf) , asomando levemente por debajo del opérculo. Se ve claramente la boca y justo por encima de esta y hacia los lados dos abultamientos relativamente gruesos (b) , rudimento de las barbillas. Señaladas con un rectángulo, se observan por transparencia las narinas, 32X.....	97
Figuras 66a y 66b. Se observa el saco vitelínico más alargado y se distingue, en tono rojo, la región perteneciente al corazón. La zona señalada como (m) pertenece a la boca, la encuadrada como (PF) es la aleta pectoral y en la foto de la derecha se observa encuadrada la válvula espiral (SG) y señalada con una flecha la región de la cloaca (CR) , 25X.....	97
Figura 67. Embrión de vida libre en Estadio 39 . En la cabeza se aprecia como comienzan a sobresalir las barbillas (b) . En la membrana aletil (FF) se observa la segregación de la aleta dorsal (DF) y la escotadura (esc) que dará lugar a la aleta anal, 8X.....	99
Figura 68. Vista ventral de la región de la cabeza de un embrión en Estadio 39 , donde se aprecian, señaladas con cuatro flechas, las barbillas que presentan forma globular y, encuadrada en blanco, la región de la boca y zona de los labios. Los tres puntos rojos separados que se aprecian a la izquierda son los arcos branquiales, 40X.....	99
Figura 69. Vista lateral de un embrión en Estadio 39 donde se aprecian las características descritas anteriormente y donde se han señalado, la zona de las barbillas (b) , la aleta pectoral (PF) , y justo detrás de ésta y por encima del saco vitelínico observamos la arteria dorsal (AD) , el conductos de Cuvier (CuD) y por delante al arco aórtico (AO) . 12.5X.....	99
Figura 70. Región caudal de un embrión de vida libre en Estadio 39 , donde se ve, en la parte interior cómo aumenta la pigmentación en torno a la región de la aleta dorsal y anal. En la zona más exterior se observa cómo se van pronunciando las escotaduras (esc) que separarán la aleta caudal de las aletas dorsal y anal.....	99
Figura 71. Vista general, embrión de vida libre en Estadio 40 , donde se observa la aleta pectoral (PF) , encuadrada en blanco, (DF) indica la aleta dorsal y (esc) la escotadura que separará la aleta caudal de la anal 12.5X.....	101
Figuras 72 y 73. En la foto de la izquierda, se parecían las cuatro barbillas perfectamente segregadas (b) , los labios (l) superiores hasta la comisura y las branquias (br) más alargadas que asoman por debajo del opérculo, así como los arcos branquiales, 32X. En la foto de la derecha se aprecia un detalle de la cabeza, donde claramente se ve el ojo con el iris (i) y también el perfil de las barbillas (b) . Encuadrada en blanco se aprecian el opérculo y las branquias, 25X.....	101.
Figura 74. Detalle de las branquias (br) , que sobresalen de la hendidura branquial en el rectángulo y de la aleta pectoral (PF) señalada con una elipse, en un embrión en Estadio 40 , 25X.....	101
Figura 75. Embrión de vida libre en Estadio 40 , detalle del rudimento de la aleta ventral (VF) sobre el pliegue de la membrana aletil (FF) por debajo de la válvula espiral (SG) e indicado con una flecha y la cloaca encuadrada en negro, 40X.....	101
Figura 76. Embrión de vida libre en Estadio 40 , detalle de la región de la cola donde se aprecia un incremento generalizado de la pigmentación así como la aleta dorsal (DF) , que aumenta de tamaño. La escotadura (esc) que separará la aleta caudal de la anal se hace más pronunciada, 12.5X.....	101

- Figura 77.** Vista general de un embrión de vida libre en **Estadio 41**, donde se observa señalada con una flecha la línea lateral (**LL**), 8X. 102
- Figura 78.** Se puede observar la parte anterior de un embrión de vida libre en **Estadio 41**, las barbillas (**b**) sobresalen claramente en el perfil, el iris (**i**) adquiere una coloración más oscura, las branquias (**br**) se alargan y sobresalen del opérculo y la aleta pectoral (**PF**) adquiere una posición oblicua, 20X. 102
- Figura 79.** Parte anterior ventral y detalle de la cabeza de un embrión de vida libre en **Estadio 41**, donde se aprecia que las aletas pectorales toman una posición oblicua, 20X, y la zona ampliada de la cabeza donde se diferencian claramente varias zonas: zona del morro donde se encuentran: (**ATC**) comisura transversal anterior, (**b**) barbillas, (**LLE**) borde del labio inferior que está interrumpido, (**o**) opérculo y (**br**) branquias, 32X. 103
- Figura 80.** Detalle de las aletas preanal (**PreF**) y ventral (**VF**) en un embrión de vida libre en **Estadio 41**, por debajo de la válvula espiral (**SG**), 20X. 103
- Figura 81.** Zona caudal de un embrión de vida libre en **Estadio 41**. El extremo final del cuerpo se alarga y se dobla hacia arriba. Las flechas señalan los segmentos de músculo en la zona de la aleta dorsal y anal. La cloaca aparece enmarcada en blanco, 20X. 103
- Figura 82.** Vista general de un embrión de vida libre en **Estadio 42**, 8X. 105.
- Figura 83.** Foto de la zona anterior ventral de un embrión de vida libre en **Estadio 42**, donde en la imagen de la izquierda se observan las yemas de los músculos (**y**) de las aletas pectorales (**PF**), 20X, y en la foto de la derecha se amplía la cabeza, donde se diferencian las barbillas (**b**), la zona de la boca, donde se distinguen los labios, el borde del labio inferior (**LLE**), en el rectángulo blanco y señalado con una flecha se aprecian los esbozos de los dientes. También se pueden ver las branquias (**br**) que sobresalen de los diferentes arcos branquiales y asoman a través del opérculo (**o**), 32X. 105
- Figura 84.** Zona anterior de un embrión de vida libre en **Estadio 42**. Desde la cabeza se observa el ojo (**E**), el perfil de una de las barbillas (**b**), las hendiduras branquiales (**br**) y la aleta pectoral (**PF**) más separada del cuerpo y la aleta ventral (**VF**) acercándose al borde de la aleta preanal, 12.5X. 105
- Figura 85.** Porción final de un embrión de vida libre en **Estadio 42** donde se diferencian las distintas aletas, dorsal (**DF**), caudal (**CF**), ventral (**VF**) y preanal (**PraF**), 12.5X. 105
- Figura 86.** Vista general de un embrión en **Estadio 43**, donde pueden observarse las diferentes aletas, 10X. 106.
- Figura 87.** Vista lateral de la zona anterior de un embrión de vida libre en **Estadio 43**. Se pueden ver las barbillas más alargadas (**b**), el ojo más definido (**E**), las hendiduras branquiales mostrando las branquias (**br**) y la aleta pectoral (**PF**), ahora más perpendicular respecto al cuerpo. 106
- Figura 88.** Vista ventral de la región anterior de un embrión de vida libre en **Estadio 43**. A la derecha se observan las distintas zonas ampliadas. Comenzando desde la cabeza, se distinguen las barbillas (**b**) más largas y la boca. A continuación un detalle de uno de los opérculos y las diferentes branquias asomando por debajo de éste y finalmente, la zona de las aletas pectorales (**PF**) sobre las que se distinguen los primordios musculares (**y**) y por transparencia se observa el corazón (**Ht**) y el rudimento de los apéndices pilóricos (**PAR**). 107
- Figura 89.** Detalle de la válvula espiral (**SG**) y la aleta ventral (**VF**) que alcanza el pliegue de la aleta preanal, 16X. 107
- Figura 90.** Vista general de un embrión de vida libre en **Estadio 44**, donde puede observarse en la membrana aletil una zona más densa, indicada con flechas (**SDR**) que son los rudimentos de los escudetes dorsales. A continuación se observa la aleta dorsal (**DF**) que ha aumentado de tamaño respecto al estadio anterior. El extremo de la cola doblado hacia abajo aparece encuadrado en blanco y señalado con una flecha. El lector también podrá apreciar como la aleta ventral (**VF**) ha sobrepasado el límite de la aleta preanal, 8X. 109
- Figura 91.** Parte anterior ventral y dorsal respectivamente en un embrión de vida libre en **Estadio 44**, 12.5X. 109
- Figura 92.** Embrión de vida libre en **Estadio 45**, donde se observa que la zona más densa en la membrana aletil da lugar a manchas independientes correspondientes a los escudetes dorsales (**SD**). También se ven las diferentes aletas: aleta dorsal (**DF**), aleta caudal (**CF**), aleta ventral (**VF**) y aletas pectorales (**PF**), 8X. 111
- Figura 93.** Detalle zona caudal de un embrión en **Estadio 45**, donde pueden verse las distintas aletas: (**DF**) aleta dorsal, (**CF**) aleta caudal, (**AF**) aleta anal, (**VF**) aleta ventral, (**PreF**) aleta preanal y los escudetes dorsales (**SD**), 16X. 111
- Figura 94v y 94d.** Vista anterior ventral y dorsal respectivamente de un embrión de vida libre en **Estadio 45**, en la foto de su izquierda se pueden observar, las barbillas bastante largas (**b**), las yemas de los músculos (**y**) en las aletas pectorales (**PF**) y en el recuadro negro la boca donde podemos ver parte de la cavidad bucofaringea, los

labios y los dientes. En la foto de la derecha se destacan el ojo (**E**), opérculo (**o**) y branquias (**br**) asomando por debajo del opérculo y a ambos lados de la membrana aletil, en la parte dorsal, aparecen dos flancos de color claro correspondiente a los rudimentos o esbozos de los escudetes laterales (**SLR**), 20X. 111

Figura 95. Juvenil en **Estadio 46**, aparecen de forma independiente, los escudetes dorsales (**SD**) en la membrana aletil (**FF**). También se aprecian claramente todas las aletas: aleta dorsal (**DF**), aleta caudal (**CF**), aleta anal (**aF**), aleta preanal (**PreF**), aletas ventrales (**VF**) y aletas pectorales (**PF**). 125

Figuras 96 y 97. Detalle hendiduras branquiales (vista ventral) y branquias (vista dorsal) que sobresalen por debajo del opérculo en un juvenil en **Estadio 46**. 125

Figuras 98 y 99. Vista ventral de la parte anterior de un juvenil en **Estadio 46** (**figura 98**), donde se ven las 4 barbillas (**b**), las aletas pectorales (**PF**) y los primordios musculares (**y**) sobre las mismas y vista ventral del morro de un juvenil en **Estadio 46**, (**figura 99**) donde se señalan las barbillas (**b**), los labios (**l**) y rodeado por una elipse la zona donde aparecen los dientes. 126

Figura 100. Juvenil al inicio del **Estadio 47**, donde se presentan los escudetes dorsales (**SD**) de forma independiente, que aún no tocan el borde de la membrana aletil. Encuadrada vemos la línea lateral (**LL**) lugar de formación de los escudetes laterales (**SL**). 126

Figura 101. Juvenil al final del **Estadio 47**, los escudetes dorsales (**SD**) ya tocan el borde de la membrana aletil. Los flancos brillantes que aparecen en la zona ventral corresponden al lugar de formación de los escudetes ventrales (**SV**). 127

Figura 102. Vista lateral de un juvenil en **Estadio 47**, donde se presentan las aletas pectorales (**PF**), preanal (**PreF**) y ventral (**VF**), así como las líneas de escudetes ventrales (**SV**) y en la zona dorsal los escudetes dorsales (**SD**) y las pinnulas (**p**) en la cabeza encuadrada en blanco. 127

Figuras 103 y 104. Aletas pelvianas (**VF**) de Juvenil en **Estadio 47**, en vista ventral, al inicio del **Estadio**, su forma es más redondeada y aquí podemos apreciar claramente en su base el inicio de formación de los radios (**r**), (**figura 103**), y al final del mismo son más alargadas y el ano (**a**) entre ambas, (**figura 104**). 128

Figura 105. Parte posterior de un juvenil en **Estadio 47** donde están definidas las aletas impares dorsal (**DF**), anal (**AF**) y caudal (**CF**), en esta última se puede observar, en rojo, como su extremo aparece curvado. 128

Figura 106. Parte anterior de un juvenil en **Estadio 47** donde se señalan las pinnulas encuadradas en blanco (**p**), inmediatamente detrás se inserta la membrana aletil en la que se pueden apreciar los dos primeros escudetes dorsales (**SD**). El ejemplar presenta un morro redondeado y la narina (**n**), bastante grande, justo por delante del ojo. 129

Figura 107. Evolución de los escudetes dorsales (**SD**) durante el **Estadio 48**. 129

Figura 108. Vista dorsal de un juvenil en **Estadio 48** donde se distinguen los escudetes dorsales (**SD**) y las dos filas paralelas de escudetes laterales (**SL**). 130

Figura 109. Vista lateral de escudetes dorsales (**SD**) de un juvenil en **Estadio 48** sometido a tinción (azul alcian – rojo alizarina), donde se destaca la membrana aletil (**FF**), que se va reasorbiendo, y la curvatura de los escudetes. 130

Figura 110. Vista dorsal de un juvenil en **Estadio 48** donde se distinguen los escudetes dorsales primarios (**SD1°**) y entre ellos un escudete dorsal secundario (**SD2°**). 131

Figura 111. Vista lateral de un juvenil en **Estadio 48** donde se distinguen los escudetes dorsales primarios (**SD1°**), señalados con flechas de color blanco y los escudetes dorsales secundarios (**SD2°**), que se van formando, señalados con flechas de color rojo. 131

Figura 112. Parte anterior de un juvenil en **Estadio 48** donde se señalan la narina (**n**), las barbillas (**b**) más largas y las pinnulas encuadradas en blanco (**p**). En la parte derecha se detallan dos patrones de pinnulas en otro ejemplar del mismo estadio. 131

Figura 113. Zona opercular de un juvenil en **Estadio 48** donde se observa: **a)** Vista ventral de los opérculos y las branquias, así como el patrón de pigmentación; **b)** Vista dorsal del opérculo y branquias sobresaliendo por debajo; **c)** Vista lateral de las branquias y de color rojo el flujo sanguíneo. La escala señalada con una línea blanca corresponde a 1 mm. 132

Figura 114. Detalle de la boca de un juvenil en **Estadio 48**. **a)** Vista ventral de la boca de un juvenil fotografiado al natural; **b)** Vista ventral de la boca de otro juvenil en el mismo estadio sometido a tinción (azul alcian – rojo alizarina) en la que se aprecian claramente las 4 placas basales donde se insertan los dientes. Podemos ver

rodeado en rojo los espacios vacíos antes ocupados por dientes que comienzan a caerse. Por debajo de las placas basales se aprecia la segunda fila de dientes mandibulares..... 132

Figura 115. Vista de las aletas pectorales de un juvenil en **Estadio 48**: **a)** vista dorsal y **b)** vista ventral..... 133.

Figura 116. Vista ventral de un juvenil en **Estadio 48** donde se aprecia en: **a)** los flancos plateados correspondientes al lugar de formación de los escudetes ventrales (**SV**), la aleta preanal (**PreF**) y válvula espiral (**SG**). Encuadradas en blanco las aletas ventrales con las yemas donde se están formando los radios (**r**) y en **b)** detalle de las aletas, entre ellas y rodeado se encuentra el ano en el que se señala con dos flechas blancas la estructura membranosa descrita en el texto. 133

Figura 117. Parte final de un juvenil en **Estadio 48** donde se ven claramente las aletas dorsal (**DF**), anal (**AF**) y caudal (**CF**), así como los radios (**r**). 134

Figura 118. Escudetes dorsales (**SD**) de un juvenil en **Estadio 49**, donde se observan encuadrados en blanco los primeros escudetes prácticamente libres de membrana y señalado con (**FF**) la membrana aletil..... 134

Figura 119. Detalle de los escudetes dorsales de un juvenil en **Estadio 49**, donde se aprecian claramente los extremos de los mismos que tienden a doblarse cada vez más..... 135

Figura 120. Detalle de los escudetes dorsales (**SD**) de un juvenil en **Estadio 49**. **a)** Escudetes sin teñir, vistos lateralmente, parecen unidos por su base. **b)** Distinguimos los escudetes sometidos a tinción azul alcian – rojo alizarina, sus bases están muy cerca pero realmente no se tocan. La membrana aletil se ha ido reabsorbiendo, dejando los extremos de los escudetes libres. 135

Figura 121. Vista dorsal de un juvenil en **Estadio 49**, sometido a tinción azul alcian – rojo alizarina, en la que se perciben los diferentes escudetes dorsales (**SD**) de color morado independientes, con forma de placa y con sus extremos doblados hacia atrás..... 136

Figura 122. Pinnulas de diferentes ejemplares a diferentes aumentos en juveniles en **Estadio 49**. La línea blanca representa 1 mm. 136

Figura 123. Cabezas de juveniles en **Estadio 49**, en **a)** se señalan con flechas rojas los lugares donde se presentan las pinnulas. En la **b)** vista dorsal de la cabeza de un ejemplar sometido a tinción azul alcian – rojo alizarina, las flechas rojas señalan también los lugares de aparición de las pinnulas que con la tinción se revelan claramente, y las curvas rojas dibujadas señalan su patrón de formación..... 137

Figura 124. Vista dorsal, **a)** y vista lateral **b)**, del morro de dos ejemplares en **Estadio 49**. En **a)** se ven claramente las narinas (**n**) y se aprecia parte de la línea latera (**LL**). Se ha señalado su recorrido en color amarillo. En la **b)** se observan las barbillas (**b**) y parte de la línea lateral (**LL**) en su recorrido ventral..... 138

Figura 125. Imagen de las bocas de dos ejemplares en **Estadio 49**, sometidos azul alcian – rojo alizarina, donde se diferencian los dientes que quedan y los huecos que han dejado los que se han caído..... 138.

Figura 126. Detalle del opérculo de un ejemplar en **Estadio 49**, donde se aprecian claramente las filas de branquiespinas en la branquia. 139

Figura 127. Vista ventral, **a)** y vista dorsal, **b)** de un ejemplar en **Estadio 49**, donde vemos las aletas pectorales (**PF**), sobre la que se señalan sus radios. Además en ambas fotos se muestra la zona del opérculo (**o**) encuadrada en blanco. En la vista dorsal se señalan los escudetes dorsales (**SD**) y los laterales (**SL**)..... 139

Figura 128. Detalle de la separación de las aletas dorsal (**DF**), caudal (**CF**) y ventral (**VF**). Además se señala parte de la línea lateral (**LL**) y con flechas negras los radios en la zona dorsal y ventral de la aleta caudal. Obsérvese como el extremo final de la cuerda dorsal se dobla hacia abajo..... 140

Figura 129. Detalle de la zona caudal de un juvenil en **Estadio 49** sometido a tinción azul alcian – rojo alizarina se señalan con flechas negras los radios en la aleta dorsal (**DF**), anal (**AF**) y en la parte ventral de la aleta caudal (**CF**). 140

Figura 130. Juvenil en **Estadio 50**, comienzan a aparecer la fila de escudetes laterales (**SL**) y ventrales (**SV**). (8X). 26 dpe 141.

Figura 131. Detalle de escudetes dorsales y laterales de un juvenil en **Estadio 50** en tinción azul alcian-rojo alizarina. Los escudetes laterales (**SL**) muestran forma de ganchos aparecen por debajo de la piel. (40X)..... 141

Figura 132. Juvenil en **Estadio 50** a los 36 dpe: **a)** la membrana aletil prácticamente ha desaparecido dejando libre los escudetes dorsales, 8X. Se señala la aleta pectoral (**PF**) paralela al cuerpo. **b)** y **c)** muestran un detalle de los escudetes laterales (**SL**), doblados como ganchos, 40X, y los escudetes ventrales (**SV**), 25X respectivamente..... 142

Figura 133. Juvenil en Estadio 50 donde se aprecian los SD con su base más ancha y aplanada. También se observan los escudetes laterales (SL) y los ventrales (SV) más doblados.	142
Figura 134. Juvenil en Estadio 50 , a) vista ventral, (SV) que han crecido y se aprecian más doblados hacia atrás. b) vista dorsal, (SL) y (SD).....	143
Figura 135. Morros de juveniles en Estadio 50 donde se puede apreciar la plasticidad característica del género <i>Acipenser</i> y en concreto de la especie <i>A. naccarii</i> en ejemplares de 2 meses (pe). Aunque dicha especie se caracteriza por su morro redondeado vemos que existe variación en los extremos de los mismos para ejemplares de dos meses post - eclosión.....	144
Figura 136. Vista lateral del morro de un juvenil en Estadio 50 donde se distinguen las cuatro barbillas (b) y la boca protractil (m) en la que a simple vista no se aprecian dientes. También se distinguen claramente los labios (l).....	144
Figura 137. a) Vista lateral de la cabeza de un juvenil en Estadio 50 en el que pueden observarse claramente las pinnulas que sobresalen y el patrón que siguen. Extendiéndose hacia el morro se observa las más dorsales y mediante la línea amarilla se señalan las que rodean al ojo y se extienden por detrás del opérculo. En una elipse blanca se señalan las narinas, (n). También se muestran las barbillas (b) y el ojo (e). b) Vista lateral de un juvenil en Estadio 50 , sometido a tinción azul alcian – rojo alizarina, donde se ve claramente el patrón de pinnulas y el sistema quimiorreceptor de la línea lateral señalada en rojo.	145
Figura 138. a) Vista dorsal de un ejemplar en Estadio 50 en el que se señalan las narinas (n) y se señala de amarillo el patrón que siguen las pinnulas a lo largo de la cabeza. b) Ejemplar sometido a tinción azul alcian – rojo alizarina, donde por transparencia observamos el sistema quimiorreceptor de la línea lateral (LL) e igualmente señalado de amarillo se resalta el patrón de pinnulas (p).....	146
Figura 139. a) Vista ventral de un ejemplar en Estadio 50 en el que claramente observamos la forma redondeada del morro y hemos señalado las barbillas así como encuadrado la boca. En b) tenemos un ejemplar sometido a tinción azul alcian – rojo alizarina donde se distinguen claramente el sistema quimiorreceptor de la línea lateral (LL) y por transparencia el patrón de pinnulas de la cabeza. Se ha señalado de color amarillo las pinnulas que se extienden por detrás del opérculo y la cintura escapular. Además se puede observar que en las placas mandibulares no se aprecian dientes.	146
Figura 140. a) Vistadorsal de las aletas pectorales de un juvenil en Estadio 50 de 50 dpe. Se puede apreciar como los radios han crecido y la pigmentación de las aletas también ha aumentado cubriendo más de la mitad de la misma. b) Vista ventral de otro ejemplar de 50 dpe sometido a tinción azul alcian-rojo alizarina, donde se observan claramente los radios de las aletas pectorales.....	147
Figura 141. a) Vista dorso – lateral de un ejemplar en Estadio 50 en la que se puede ver la forma y pigmentación de una de las aletas pectorales. b) Vista dorsal de la aleta de un ejemplar sometido azul alcian – rojo alizarina donde se muestran claramente los radios.	147
Figura 142. Evolución de las aletas ventrales a lo largo del Estadio 50 , desde los 26 dpe hasta los 51 dpe, donde los radios casi alcanzan el borde distal posterior de la aleta.	148
Figura 143. Evolución de las aletas dorsal y anal a lo largo del Estadio 50	149
Figura 144. Detalle de la zona caudal de dos juvenil al final del Estadio 50 , a los 36dpe, a) en fresco, b) sometido a tinción azul alcian – rojo alizarina. En ambos se señalan con flechas negras los radios que comienzan a formarse en la parte superior de la aleta caudal y los ya formados en la parte inferior de la misma. En ambas zonas encuadradas en blanco se detalla la separación entre aletas dorsal y caudal, y aletas anal y caudal.	150
Figura 145. Aleta caudal de dos juvenil en Estadio 50 , a los 51 dpe, el de arriba sin teñir y en la parte de abajo uno sometido a tinción azul alcian – rojo alizarina. En ambos se revelan claramente los radios.	150
Figura 146. Juvenil en Estadio 51 sometido a tinción azul alcian – rojo alizarina donde se observan: a) la fila de escudetes dorsales (SD) y las dos filas de escudetes laterales (SL), b) detalle de escudetes laterales (SL) de la región anterior que presentan una forma más puntiaguda, encuadrados en rojo y c) detalle de los escudetes laterales (SL) de la región más caudal cuyos extremos se encuentran más doblados presentando una forma más aplanada, encuadrados en amarillo.....	151
Figura 147. Juvenil en Estadio 51 sometido a tinción azul alcian – rojo alizarina, donde a) vista lateral con fila de escudetes dorsales (SD), laterales (SL) y ventrales (SV), b) detalle de los escudetes dorsales (SD) su base ahora es más festoneada y c) detalle escudetes ventrales (SV) forma estrellada.....	152

- Figura 148.** Vista dorsal de un juvenil en **Estadio 51** (de 3 meses de edad), sometido a tinción azul alcian – rojo alizarina, donde observamos la evolución de los escudetes dorsales (**SD**) y laterales (**SL**) que van adquiriendo la forma de placas características de los adultos..... 152
- Figura 149.** Vista lateral de dos escudetes dorsales secundarios (**SD 2º**), rodeados en negro, entre los escudetes primarios (**SD**) en un juvenil en **Estadio 51** (de 3 meses de edad), sometido a tinción azul alcian – rojo alizarina, también se señalan las filas de escudetes laterales y ventrales 153.
- Figura 150.** Vista dorsal de un escudete dorsal secundario (**SD 2º**) entre dos escudetes primarios en un juvenil en **Estadio 51** (de 3 meses de edad), sometido a tinción azul alcian – rojo alizarina. 153
- Figura 151.** Escudetes de un juvenil en **Estadio 41**. **a)** Vista lateral donde se señalan los **SD** y los **SL** con la forma característica de placa. **b)** Vista dorsal de los **SD** y **SL**, que aunque en la vista lateral se ven con forma de placa podemos distinguir todavía los ganchos, cada vez más doblados. **c)** detalle de los **SD** sometidos a tinción azul alcian – rojo alizarina. **d)** detalle de la forma de los **SD** sin teñir. **e)** detalle de los **SV** en vista lateral. 154
- Figura 152.** Detalle de los (**SV**) escudetes ventrales formados entre las aletas ventrales (**VF**) y anal (**aF**) en un ejemplar en **Estadio 51** 155.
- Figura 153. a)** Vista lateral de un ejemplar en **Estadio 51**, sometido a tinción azul alcian – rojo alizarina, donde se destacan encuadrados el dibujo de los escudetes ventrales (**SV**) y las pinnulas que aparecen detrás de las aletas ventrales. **b)** detalle de los (**SV**) y pinnulas en vista ventral..... 155
- Figura 154.** Juvenil en **Estadio 51**. **a)** Vista dorsal de la cabeza; **b)** Vista ventral, donde se aprecian claramente las 4 barbillas, dos centrales algo más adelantadas que las dos laterales, se aprecia el sistema de la LL y la boca. **c)** Vista lateral, donde distinguen las narinas, el patrón de pinnulas que baja hasta el morro y las barbillas. **d y e)** detalle de las barbillas. **f y g)** detalle de la boca sin tinción y con tinción azul – alcian – rojo alizarina, no se observan dientes. 156
- Figura 155.** Vista lateral de un juvenil en **Estadio 51**, podemos apreciar la forma redondeada del morro, el sistema de quimiorreceptores de la línea lateral (LL), en color amarillo, el patrón de pinnulas, las narinas y las barbillas 156.
- Figura 156.** Aletas pectorales de un juvenil en **Estadio 51**, a) vista dorsal, b) vista ventral y c) vista dorsal con tinción azul – alcian – rojo alizarina. En las tres se distingue la estructura de la yema de la que parten los radios..... 157.
- Figura 157.** Vista dorsal de las aletas ventrales (**VF**) de un juvenil en **Estadio 51**, también se han señalado los escudetes dorsales (**SD**) y los laterales (**SL**). 157
- Figura 158.** Detalle de las aletas dorsal (**DF**) y anal (**aF**), donde se aprecian claramente los radios. Además se observa la separación entre las aletas ventrales (**VF**) y la anal (**aF**), así como la formación de escudetes entre ellas (**SV**), al igual que los escudetes dorsales (**SD**) entre la aleta dorsal (**DF**) y la caudal. 158
- Figura 159.** Zona caudal de un juvenil en **Estadio 51** donde se diferencian la aleta dorsal. (**DF**) separada de la caudal (**CF**) y sobre el pedúnculo caudal un escudete dorsal (**SD**) rodeado por una elipse. También se marca con una flecha roja el punto de inflexión del extremo de la caudal y la aleta anal (**aF**). 158
- Figura 160.** Zona caudal de los radios de la caudal, la fila de escudetes laterales (**SL**) y los escudetes dorsales (**SD**) por encima del pedúnculo caudal y rodeados por una elipse, entre las aletas dorsal y un juvenil en **Estadio 51** sometido a tinción azul alcian – rojo alizarina, donde se diferencian caudal. 159
- Figura 161.** Aleta caudal de un juvenil hacia el final del **Estadio 51**, donde se observa como la parte inferior de la membrana de la aleta caudal es mucho más ancha que la parte superior. La flexión que ha sufrido la porción distal está claramente marcada..... 159
- Figura 162.** Crecimiento de a y b de la aleta caudal a lo largo del desarrollo..... 165
- Figura 163.** Crecimiento de a y b de la aleta caudal con la longitud. 166
- Figura 164.** Relación entre las longitudes medidas de la aleta caudal..... 166
- Figura 165.** Crecimiento en longitud y anchura para las aletas derecha e izquierda en el desarrollo con el tiempo..... 167
- Figura 166.** Crecimiento en longitud y anchura para las aletas derecha e izquierda respecto a la longitud total (LT). 168
- Figura 167.** Relación del crecimiento entre ambas longitudes para las diferentes aletas 168
- Figura 168.** Evolución de la longitud y anchura del saco vitelínico en el desarrollo 169

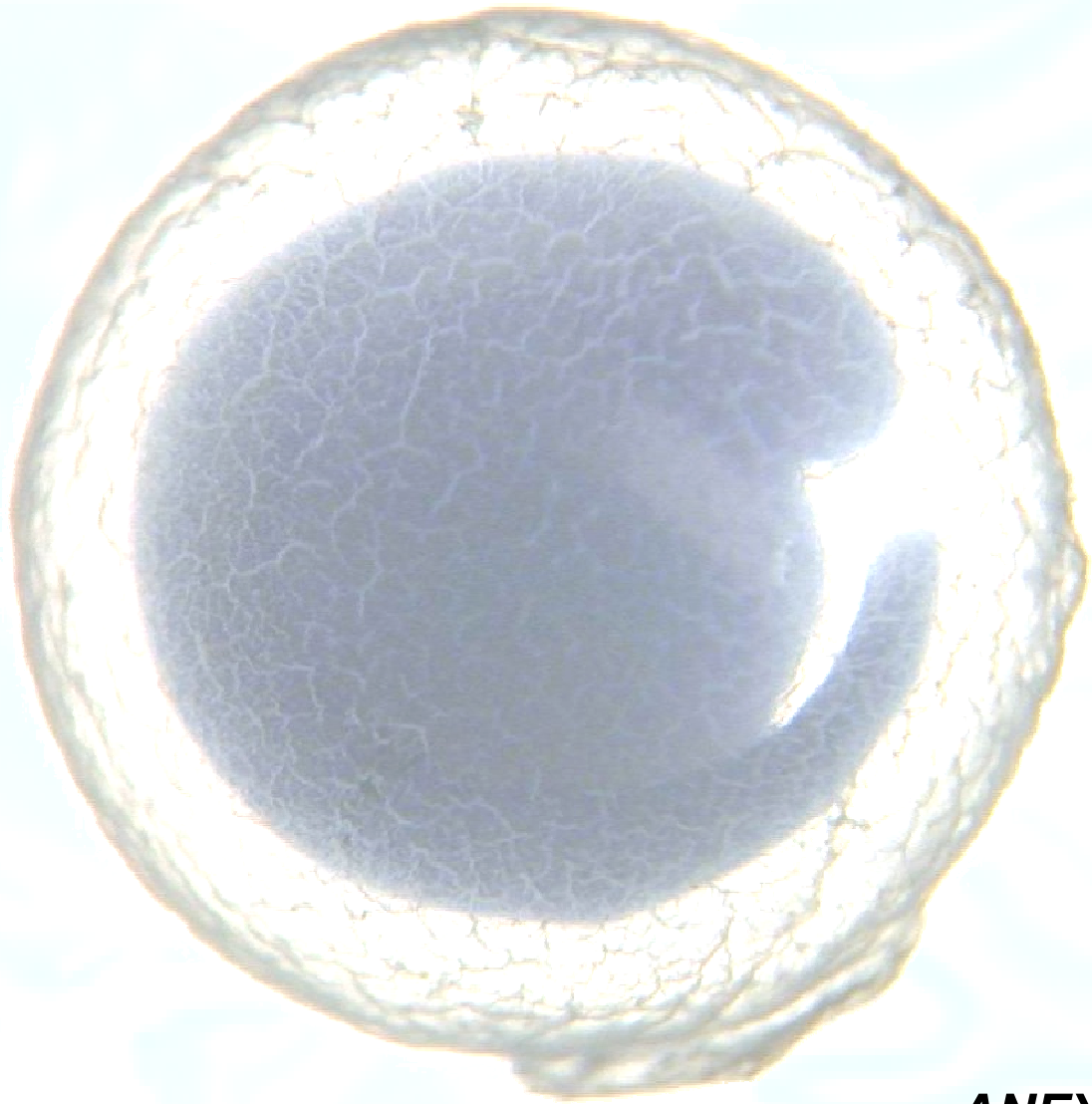
Figura 169. Evolución de la longitud y anchura del saco vitelínico con la longitud total (LT)	170
Figura 170. Relación inversa entre la anchura y longitud del saco vitelínico.	170
Figura 171. Relación de las diferentes medidas cefálicas con la longitud de la cabeza (hl).	171

Tablas

Tabla 1. Periodicidad de los muestreos durante el primer año.....	33
Tabla 2. Variables utilizadas en el análisis morfométrico de la cabeza y lugar donde están descritas.....	34
Tabla 3. Comparación del diámetros de huevos no fecundados en Acipenséridos, modificado de Dettlaff et al., 1993.....	48
Tabla 4. Cronología del desarrollo embrionario en <i>Acipenser naccarii</i> , desde la fecundación hasta la eclosión.....	76
Tabla 5. Comparación del desarrollo embrionario (Estadios 1 – 36) de diferentes Acipenséridos y a distintas temperaturas.....	77
Tabla 6. Principales eventos que tienen lugar en el desarrollo embrionario de <i>Acipenser naccarii</i> , desde el final de la neurulación hasta la eclosión	78
Tabla 7. Cronología del desarrollo del embrión de vida libre (Estadios 37 – 45)	112-113
Tabla 8. Propuesta de Estadios en la Etapa Juvenil (Estadios 46 – 51).....	160
Tabla 9. Intervalo de muestreo en la etapa juvenil. Equivalencia desde el (Estadios 46 – 51) en dpe, dpf y horas totales (hpe) y (hpf)	161
Tabla 10. Relación de las medidas de longitud de la aleta caudal con el tiempo (hpf), con la longitud total LT (mm) y entre ellas.....	166
Tabla 11. Relación del largo y ancho derecho e izquierdo de las aletas pectorales con el tiempo (hpf), LT (mm) y entre ellos.....	169
Tabla 12. Relación del largo y ancho del saco vitelínico a lo largo del tiempo (hpf), con LT (mm) y entre ellas.....	170
Tabla 13. Relación de las diferentes medidas de la región cefálica con el tiempo (hpf) y con la longitud de la cabeza (hl).....	171

Láminas

Lámina 1: Periodo segmentación – blastulación (Estadios 1 – 12).....	81
Lámina 2: Gastrulación (Estadios 13 – 18)	83
Lámina 3: Neurulación (Estadios 18 – 23)	83
Lámina 4: Final neurulación – fusión placas laterales (Estadio 23 – 26).....	85
Lámina 5: Final fusión placas laterales – eclosión de los primeros embriones (26 – 34).....	87
Lámina 6: Eclosión (Estadios 35 y 36).....	89
Lámina 7: Embriones de vida libre de <i>A. naccarii</i> , desde el Estadio 36 (momento de la eclosión) hasta el Estadio 45 (transición a la alimentación exógena).....	117
Lámina 8: Región cefálica de los embriones de vida libre de <i>A. naccarii</i> en los Estadios (37 a 45). Vista desde el lado ventral	119
Lámina 9: Evolución de la región caudal en embriones de vida libre de <i>A. naccarii</i> . Desde el (Estadio 37 a 45), donde puede apreciarse la formación de las diferentes aletas a lo largo del tiempo en que transcurren los siguientes estadios.....	121



ANEXO

ANEXO

Relaciones de crecimiento de la aleta caudal con el tiempo y con la longitud total

Comparación de Modelos Alternativos

Modelo	Correlación	R-cuadrado
Lineal	0,9041	81,74%
Raiz cuadrada-Y	0,8994	80,89%
Raiz cuadrada-X	0,8837	78,08%
Multiplicativo	0,8831	77,99%
Exponencial	0,8733	76,27%
Doble inverso	0,8700	75,69%
curva-S	-0,8531	72,78%
Logarítmico-X	0,8500	72,25%
Inverso-Y	-0,7700	59,30%
Inverso-X	-0,7624	58,12%
Logístico	<sin ajuste>	
Log Probit	<sin ajuste>	

Parámetros del modelo lineal con el tiempo

Análisis de Regresión - Modelo Lineal $Y = a + b \cdot X$

Variable dependiente: a

Variable independiente: tiempo

Parámetro	Estimación	Error estándar	Estadístico T	P-Valor
Ordenada	3,11285	0,096278	32,3319	0,0000
Pendiente	0,00498527	0,000130686	38,1468	0,0000

Análisis de la Varianza

Fuente	Suma de cuadrados	GL	Cuadrado medio	Cociente-F	P-Valor
Modelo	2079,01	1	2079,01	1455,18	0,0000
Residuo	464,328	325	1,4287		
Total (Corr.)	2543,34	326			

Coefficiente de Correlación = 0,904121

R-cuadrado = 81,7434 porcentaje

R-cuadrado (ajustado para g.l.) = 81,6872 porcentaje

Error estándar de est. = 1,19528

Error absoluto medio = 0,864986

Estadístico de Durbin-Watson = 0,87732 (P=0,0000)

Autocorrelación residual en Lag 1 = 0,560645

Análisis de Regresión - Modelo Lineal $Y = a + b \cdot X$

Variable dependiente: b

Variable independiente: tiempo

Parámetro	Estimación	Error estándar	Estadístico T	P-Valor
Ordenada	3,27581	0,0978881	33,4648	0,0000
Pendiente	0,00513495	0,000132879	38,6438	0,0000

Análisis de la Varianza

Fuente	Suma de cuadrados	GL	Cuadrado medio	Cociente-F	P-Valor
Modelo	2206,59	1	2206,59	1493,34	0,0000
Residuo	480,226	325	1,47762		
Total (Corr.)	2686,82	326			

Coefficiente de Correlación = 0,906237

R-cuadrado = 82,1266 porcentaje

R-cuadrado (ajustado para g.l.) = 82,0716 porcentaje

Error estándar de est. = 1,21557

Error absoluto medio = 0,895553

Estadístico de Durbin-Watson = 0,77142 (P=0,0000)

Autocorrelación residual en Lag 1 = 0,613632

Parámetros del modelo lineal con la longitud total LT (mm)

Análisis de Regresión - Modelo Lineal $Y = a + b \cdot X$

Variable dependiente: a

Variable independiente: LT

Parámetro	Estimación	Error estándar	Estadístico T	P-Valor
Ordenada	1,6095	0,0856804	18,7849	0,0000
Pendiente	0,216585	0,00368784	58,7295	0,0000

Análisis de la Varianza

Fuente	Suma de cuadrados	GL	Cuadrado medio	Cociente-F	P-Valor
Modelo	2308,48	1	2308,48	3449,16	0,0000
Residuo	206,81	309	0,669289		
Total (Corr.)	2515,29	310			

Coefficiente de Correlación = 0,958008

R-cuadrado = 91,7779 porcentaje

R-cuadrado (ajustado para g.l.) = 91,7513 porcentaje

Error estándar de est. = 0,818101

Error absoluto medio = 0,605821

Estadístico de Durbin-Watson = 1,09812 (P=0,0000)

Autocorrelación residual en Lag 1 = 0,437821

Análisis de Regresión - Modelo Lineal $Y = a + b \cdot X$

Variable dependiente: b

Variable independiente: LT

Parámetro	Estimación	Error estándar	Estadístico T	P-Valor
Ordenada	1,74125	0,0911569	19,1017	0,0000
Pendiente	0,222108	0,0039242	56,5995	0,0000

Análisis de la Varianza

Fuente	Suma de cuadrados	GL	Cuadrado medio	Cociente-F	P-Valor
Modelo	2429,78	1	2429,78	3203,50	0,0000
Residuo	234,369	309	0,758477		
Total (Corr.)	2664,15	310			

Coefficiente de Correlación = 0,955002

R-cuadrado = 91,2028 porcentaje

R-cuadrado (ajustado para g.l.) = 91,1744 porcentaje

Error estándar de est. = 0,870906

Error absoluto medio = 0,676808

Estadístico de Durbin-Watson = 0,924759 (P=0,0000)

Autocorrelación residual en Lag 1 = 0,526343

Parámetros del modelo lineal entre las longitudes medidas sobre la aleta caudal

Análisis de Regresión - Modelo Lineal $Y = a + b \cdot X$

Variable dependiente: a

Variable independiente: b

Parámetro	Estimación	Error estándar	Estadístico T	P-Valor
Ordenada	-0,0712629	0,0279526	-2,54942	0,0113
Pendiente	0,97318	0,00418806	232,37	0,0000

Análisis de la Varianza

Fuente	Suma de cuadrados	GL	Cuadrado medio	Cociente-F	P-Valor
Modelo	2520,32	1	2520,32	53995,90	0,0000
Residuo	15,0764	323	0,0466761		
Total (Corr.)	2535,39	324			

Coefficiente de Correlación = 0,997022

R-cuadrado = 99,4054 porcentaje

R-cuadrado (ajustado para g.l.) = 99,4035 porcentaje

Error estándar de est. = 0,216047

Error absoluto medio = 0,175307

Estadístico de Durbin-Watson = 0,926771 (P=0,0000)

Autocorrelación residual en Lag 1 = 0,536284

Relaciones de crecimiento de las aletas pectorales con el tiempo y con LT (mm)

Comparación de Modelos Alternativos

Modelo	Correlación	R-cuadrado
Lineal	0,8360	69,88%
Raiz cuadrada-Y	0,8338	69,52%
Exponencial	0,8132	66,13%
Raiz cuadrada-X	0,7934	62,95%
Multiplicativo	0,7438	55,33%
Logarítmico-X	0,7390	54,62%
Inverso-Y	-0,7192	51,73%
curva-S	-0,6443	41,52%
Inverso-X	-0,6158	37,92%
Doble inverso	0,6106	37,28%
Logístico	<sin ajuste>	
Log Probit	<sin ajuste>	

Parámetros del modelo lineal para ambas aletas con el tiempo

Análisis de Regresión - Modelo Lineal $Y = a + b \cdot X$

Variable dependiente: APD LARGO

Variable independiente: HPF

Parámetro	Estimación	Error estándar	Estadístico T	P-Valor
Ordenada	0,752839	0,0990195	7,60293	0,0000
Pendiente	0,00230332	0,00010194	22,5949	0,0000

Análisis de la Varianza

Fuente	Suma de cuadrados	GL	Cuadrado medio	Cociente-F	P-Valor
Modelo	287,533	1	287,533	510,53	0,0000
Residuo	123,905	220	0,563205		
Total (Corr.)	411,438	221			

Coefficiente de Correlación = 0,835972

R-cuadrado = 69,8848 porcentaje

R-cuadrado (ajustado para g.l.) = 69,748 porcentaje

Error estándar de est. = 0,75047

Error absoluto medio = 0,564701

Estadístico de Durbin-Watson = 0,987989 (P=0,0000)

Autocorrelación residual en Lag 1 = 0,505795

Análisis de Regresión - Modelo Lineal $Y = a + b \cdot X$

Variable dependiente: API LARGO

Variable independiente: HPF

Parámetro	Estimación	Error estándar	Estadístico T	P-Valor
Ordenada	0,679443	0,09852	6,8965	0,0000
Pendiente	0,00235196	0,000102917	22,853	0,0000

Análisis de la Varianza

Fuente	Suma de cuadrados	GL	Cuadrado medio	Cociente-F	P-Valor
Modelo	341,418	1	341,418	522,26	0,0000
Residuo	152,319	233	0,653731		
Total (Corr.)	493,738	234			

Coefficiente de Correlación = 0,831563

R-cuadrado = 69,1498 porcentaje

R-cuadrado (ajustado para g.l.) = 69,0173 porcentaje

Error estándar de est. = 0,808536

Error absoluto medio = 0,608409

Estadístico de Durbin-Watson = 0,965283 (P=0,0000)

Autocorrelación residual en Lag 1 = 0,511948

Análisis de Regresión - Modelo Lineal $Y = a + b \cdot X$

Variable dependiente: APD ANCHO

Variable independiente: HPF

Parámetro	Estimación	Error estándar	Estadístico T	P-Valor
Ordenada	0,656935	0,101273	6,48679	0,0000
Pendiente	0,00205937	0,0000999773	20,5984	0,0000

Análisis de la Varianza

Fuente	Suma de cuadrados	GL	Cuadrado medio	Cociente-F	P-Valor
Modelo	215,037	1	215,037	424,29	0,0000
Residuo	100,855	199	0,50681		
Total (Corr.)	315,892	200			

Coefficiente de Correlación = 0,825063

R-cuadrado = 68,0729 porcentaje

R-cuadrado (ajustado para g.l.) = 67,9124 porcentaje

Error estándar de est. = 0,711906

Error absoluto medio = 0,503982

Estadístico de Durbin-Watson = 0,967277 (P=0,0000)

Autocorrelación residual en Lag 1 = 0,515671

Análisis de Regresión - Modelo Lineal $Y = a + b \cdot X$

Variable dependiente: API ANCHO

Variable independiente: HPF

Parámetro	Estimación	Error estándar	Estadístico T	P-Valor
Ordenada	0,626391	0,0984709	6,36118	0,0000
Pendiente	0,0019851	0,000101181	19,6192	0,0000

Análisis de la Varianza

Fuente	Suma de cuadrados	GL	Cuadrado medio	Cociente-F	P-Valor
Modelo	213,82	1	213,82	384,91	0,0000
Residuo	115,544	208	0,555499		
Total (Corr.)	329,364	209			

Coefficiente de Correlación = 0,805724

R-cuadrado = 64,9191 porcentaje

R-cuadrado (ajustado para g.l.) = 64,7504 porcentaje

Error estándar de est. = 0,745318

Error absoluto medio = 0,549268

Estadístico de Durbin-Watson = 0,988255 (P=0,0000)

Autocorrelación residual en Lag 1 = 0,50025

Parámetros del modelo lineal para ambas aletas con la LT (mm)

Análisis de Regresión - Modelo Lineal $Y = a + b \cdot X$

Variable dependiente: APD LARGO

Variable independiente: LTmm

Parámetro	Estimación	Error estándar	Estadístico T	P-Valor
Ordenada	0,159809	0,0805687	1,98351	0,0489
Pendiente	0,102656	0,00278531	36,8562	0,0000

Análisis de la Varianza

Fuente	Suma de cuadrados	GL	Cuadrado medio	Cociente-F	P-Valor
Modelo	323,908	1	323,908	1358,38	0,0000
Residuo	42,206	177	0,238452		
Total (Corr.)	366,114	178			

Coefficiente de Correlación = 0,940595

R-cuadrado = 88,4719 porcentaje

R-cuadrado (ajustado para g.l.) = 88,4068 porcentaje

Error estándar de est. = 0,488315

Error absoluto medio = 0,364049

Estadístico de Durbin-Watson = 1,18476 (P=0,0000)

Autocorrelación residual en Lag 1 = 0,400128

Análisis de Regresión - Modelo Lineal $Y = a + b \cdot X$

Variable dependiente: API LARGO
Variable independiente: LTmm

Parámetro	Estimación	Error estándar	Estadístico T	P-Valor
Ordenada	0,0281389	0,0900447	0,312499	0,7550
Pendiente	0,106048	0,00323888	32,7422	0,0000

Análisis de la Varianza

Fuente	Suma de cuadrados	GL	Cuadrado medio	Cociente-F	P-Valor
Modelo	364,754	1	364,754	1072,05	0,0000
Residuo	64,6456	190	0,34024		
Total (Corr.)	429,4	191			

Coefficiente de Correlación = 0,921657
R-cuadrado = 84,9451 porcentaje
R-cuadrado (ajustado para g.l.) = 84,8659 porcentaje
Error estándar de est. = 0,583301
Error absoluto medio = 0,425614
Estadístico de Durbin-Watson = 1,14816 (P=0,0000)
Autocorrelación residual en Lag 1 = 0,394226

Análisis de Regresión - Modelo Lineal $Y = a + b \cdot X$

Variable dependiente: APD ANCHO
Variable independiente: LTmm

Parámetro	Estimación	Error estándar	Estadístico T	P-Valor
Ordenada	0,113849	0,0734371	1,55029	0,1229
Pendiente	0,0932956	0,00250548	37,2366	0,0000

Análisis de la Varianza

Fuente	Suma de cuadrados	GL	Cuadrado medio	Cociente-F	P-Valor
Modelo	260,094	1	260,094	1386,57	0,0000
Residuo	32,0764	171	0,187581		
Total (Corr.)	292,17	172			

Coefficiente de Correlación = 0,943511
R-cuadrado = 89,0213 porcentaje
R-cuadrado (ajustado para g.l.) = 88,9571 porcentaje
Error estándar de est. = 0,433107
Error absoluto medio = 0,310045
Estadístico de Durbin-Watson = 1,48384 (P=0,0003)
Autocorrelación residual en Lag 1 = 0,239022

Análisis de Regresión - Modelo Lineal $Y = a + b \cdot X$

Variable dependiente: API ANCHO

Variable independiente: LTmm

Parámetro	Estimación	Error estándar	Estadístico T	P-Valor
Ordenada	0,0379102	0,0830499	0,456475	0,6486
Pendiente	0,0909832	0,00294222	30,9233	0,0000

Análisis de la Varianza

Fuente	Suma de cuadrados	GL	Cuadrado medio	Cociente-F	P-Valor
Modelo	261,561	1	261,561	956,25	0,0000
Residuo	49,7821	182	0,273528		
Total (Corr.)	311,343	183			

Coefficiente de Correlación = 0,916573

R-cuadrado = 84,0106 porcentaje

R-cuadrado (ajustado para g.l.) = 83,9227 porcentaje

Error estándar de est. = 0,522999

Error absoluto medio = 0,388609

Estadístico de Durbin-Watson = 1,22035 (P=0,0000)

Autocorrelación residual en Lag 1 = 0,38664

Parámetros del modelo lineal entre las longitudes medidas sobre cada una de las aletas pectorales

Análisis de Regresión - Modelo Lineal $Y = a + b \cdot X$

Variable dependiente: APD ANCHO

Variable independiente: APD LARGO

Parámetro	Estimación	Error estándar	Estadístico T	P-Valor
Ordenada	0,144239	0,0653225	2,2081	0,0284
Pendiente	0,841181	0,0210666	39,9296	0,0000

Análisis de la Varianza

Fuente	Suma de cuadrados	GL	Cuadrado medio	Cociente-F	P-Valor
Modelo	280,629	1	280,629	1594,37	0,0000
Residuo	34,6744	197	0,176012		
Total (Corr.)	315,304	198			

Coefficiente de Correlación = 0,943413

R-cuadrado = 89,0029 porcentaje

R-cuadrado (ajustado para g.l.) = 88,947 porcentaje

Error estándar de est. = 0,419538

Error absoluto medio = 0,295323

Estadístico de Durbin-Watson = 1,7399 (P=0,0332)

Autocorrelación residual en Lag 1 = 0,124894

Análisis de Regresión - Modelo Lineal $Y = a + b \cdot X$

Variable dependiente: API ANCHO
Variable independiente: API LARGO

Parámetro	Estimación	Error estándar	Estadístico T	P-Valor
Ordenada	0,205283	0,0636433	3,22552	0,0015
Pendiente	0,786001	0,0210617	37,3189	0,0000

Análisis de la Varianza

Fuente	Suma de cuadrados	GL	Cuadrado medio	Cociente-F	P-Valor
Modelo	286,562	1	286,562	1392,70	0,0000
Residuo	42,5923	207	0,20576		
Total (Corr.)	329,155	208			

Coefficiente de Correlación = 0,93306
R-cuadrado = 87,0601 porcentaje
R-cuadrado (ajustado para g.l.) = 86,9976 porcentaje
Error estándar de est. = 0,453608
Error absoluto medio = 0,320513
Estadístico de Durbin-Watson = 1,24285 (P=0,0000)
Autocorrelación residual en Lag 1 = 0,333514

Relaciones del crecimiento de la medidas del saco vitelínico con el tiempo y LT

Comparación de Modelos Alternativos

Modelo	Correlación	R-cuadrado
Lineal	0,6214	38,61%
Raiz cuadrada-Y	0,6211	38,58%
Exponencial	0,6195	38,38%
Inverso-Y	-0,6118	37,43%
Raiz cuadrada-X	0,6095	37,15%
Multiplicativo	0,5967	35,61%
Logarítmico-X	0,5945	35,34%
Doble inverso	0,5625	31,64%
curva-S	-0,5609	31,46%
Inverso-X	-0,5544	30,74%
Logístico	<sin ajuste>	
Log Probit	<sin ajuste>	

Parámetros del modelo lineal entre las longitudes del saco vitelínico y el tiempo

Análisis de Regresión - Modelo Lineal $Y = a + b \cdot X$

Variable dependiente: LARGO
Variable independiente: tiempo HPF

Parámetro	Estimación	Error estándar	Estadístico T	P-Valor
Ordenada	2,27151	0,130128	17,456	0,0000
Pendiente	0,00691008	0,000637164	10,8451	0,0000

Análisis de la Varianza

Fuente	Suma de cuadrados	GL	Cuadrado medio	Cociente-F	P-Valor
Modelo	12,7327	1	12,7327	117,62	0,0000
Residuo	20,2441	187	0,108257		
Total (Corr.)	32,9768	188			

Coefficiente de Correlación = 0,621378
R-cuadrado = 38,6111 porcentaje
R-cuadrado (ajustado para g.l.) = 38,2828 porcentaje
Error estándar de est. = 0,329024
Error absoluto medio = 0,236421
Estadístico de Durbin-Watson = 0,724564 (P=0,0000)
Autocorrelación residual en Lag 1 = 0,637073

Análisis de Regresión - Modelo Lineal $Y = a + b \cdot X$

Variable dependiente: ANCHO
Variable independiente: tiempo HPF

Parámetro	Estimación	Error estándar	Estadístico T	P-Valor
Ordenada	2,90875	0,122828	23,6814	0,0000
Pendiente	-0,00411516	0,000599991	-6,8587	0,0000

Análisis de la Varianza

Fuente	Suma de cuadrados	GL	Cuadrado medio	Cociente-F	P-Valor
Modelo	4,42275	1	4,42275	47,04	0,0000
Residuo	17,2992	184	0,0940174		
Total (Corr.)	21,7219	185			

Coefficiente de Correlación = -0,451229
R-cuadrado = 20,3607 porcentaje
R-cuadrado (ajustado para g.l.) = 19,9279 porcentaje
Error estándar de est. = 0,306623
Error absoluto medio = 0,245082
Estadístico de Durbin-Watson = 0,418056 (P=0,0000)
Autocorrelación residual en Lag 1 = 0,789918

Parámetros del modelo lineal entre las longitudes del saco vitelínico y LT (mm)

Análisis de Regresión - Modelo Lineal $Y = a + b \cdot X$

Variable dependiente: LARGO

Variable independiente: LT

Parámetro	Estimación	Error estándar	Estadístico T	P-Valor
Ordenada	1,33526	0,126456	10,5591	0,0000
Pendiente	0,201598	0,0107307	18,7871	0,0000

Análisis de la Varianza

Fuente	Suma de cuadrados	GL	Cuadrado medio	Cociente-F	P-Valor
Modelo	23,2829	1	23,2829	352,95	0,0000
Residuo	12,6654	192	0,0659658		
Total (Corr.)	35,9484	193			

Coefficiente de Correlación = 0,804784

R-cuadrado = 64,7677 porcentaje

R-cuadrado (ajustado para g.l.) = 64,5842 porcentaje

Error estándar de est. = 0,256838

Error absoluto medio = 0,205258

Estadístico de Durbin-Watson = 0,866598 (P=0,0000)

Autocorrelación residual en Lag 1 = 0,558345

Análisis de Regresión - Modelo Lineal $Y = a + b \cdot X$

Variable dependiente: ANCHO

Variable independiente: LT

Parámetro	Estimación	Error estándar	Estadístico T	P-Valor
Ordenada	3,36064	0,13638	24,6417	0,0000
Pendiente	-0,110121	0,0115814	-9,50847	0,0000

Análisis de la Varianza

Fuente	Suma de cuadrados	GL	Cuadrado medio	Cociente-F	P-Valor
Modelo	6,83625	1	6,83625	90,41	0,0000
Residuo	14,2909	189	0,0756131		
Total (Corr.)	21,1271	190			

Coefficiente de Correlación = -0,568838

R-cuadrado = 32,3577 porcentaje

R-cuadrado (ajustado para g.l.) = 31,9998 porcentaje

Error estándar de est. = 0,274978

Error absoluto medio = 0,231699

Estadístico de Durbin-Watson = 0,456427 (P=0,0000)

Autocorrelación residual en Lag 1 = 0,768906

Parámetros del modelo lineal entre las longitudes medidas del saco vitelínico

Análisis de Regresión - Modelo Lineal $Y = a + b \cdot X$

Variable dependiente: ANCHO
Variable independiente: LARGO

Parámetro	Estimación	Error estándar	Estadístico T	P-Valor
Ordenada	4,02167	0,152593	26,3556	0,0000
Pendiente	-0,527411	0,0411182	-12,8267	0,0000

Análisis de la Varianza

Fuente	Suma de cuadrados	GL	Cuadrado medio	Cociente-F	P-Valor
Modelo	10,1211	1	10,1211	164,52	0,0000
Residuo	11,8114	192	0,0615177		
Total (Corr.)	21,9325	193			

Coefficiente de Correlación = -0,679313
R-cuadrado = 46,1467 porcentaje
R-cuadrado (ajustado para g.l.) = 45,8662 porcentaje
Error estándar de est. = 0,248028
Error absoluto medio = 0,203873
Estadístico de Durbin-Watson = 0,812821 (P=0,0000)
Autocorrelación residual en Lag 1 = 0,587688

Parámetros del modelo lineal para las medidas de la región cefálica con el tiempo

Análisis de Regresión - Modelo Lineal $Y = a + b \cdot X$

Variable dependiente: s_b
Variable independiente: H TOTALES

Parámetro	Estimación	Error estándar	Estadístico T	P-Valor
Ordenada	-1,11501	0,276095	-4,03852	0,0001
Pendiente	0,00295409	0,00013016	22,6958	0,0000

Análisis de la Varianza

Fuente	Suma de cuadrados	GL	Cuadrado medio	Cociente-F	P-Valor
Modelo	1805,18	1	1805,18	515,10	0,0000
Residuo	396,013	113	3,50454		
Total (Corr.)	2201,2	114			

Coefficiente de Correlación = 0,905589
R-cuadrado = 82,0092 porcentaje
R-cuadrado (ajustado para g.l.) = 81,85 porcentaje
Error estándar de est. = 1,87204
Error absoluto medio = 0,920595
Estadístico de Durbin-Watson = 1,73216 (P=0,0759)
Autocorrelación residual en Lag 1 = 0,133431

Análisis de Regresión - Modelo Lineal $Y = a + b \cdot X$

Variable dependiente: b_mc
Variable independiente: H TOTALES

Parámetro	Estimación	Error estándar	Estadístico T	P-Valor
Ordenada	-1,27867	0,20946	-6,10461	0,0000
Pendiente	0,00356444	0,0000987462	36,097	0,0000

Análisis de la Varianza

Fuente	Suma de cuadrados	GL	Cuadrado medio	Cociente-F	P-Valor
Modelo	2628,2	1	2628,2	1302,99	0,0000
Residuo	227,926	113	2,01705		
Total (Corr.)	2856,13	114			

Coefficiente de Correlación = 0,959269
R-cuadrado = 92,0197 porcentaje
R-cuadrado (ajustado para g.l.) = 91,9491 porcentaje
Error estándar de est. = 1,42023
Error absoluto medio = 0,977142
Estadístico de Durbin-Watson = 1,47005 (P=0,0020)
Autocorrelación residual en Lag 1 = 0,257043

Análisis de Regresión - Modelo Lineal $Y = a + b \cdot X$

Variable dependiente: s_mc
Variable independiente: H TOTALES

Parámetro	Estimación	Error estándar	Estadístico T	P-Valor
Ordenada	-2,35477	0,347971	-6,76715	0,0000
Pendiente	0,00635712	0,000164045	38,7523	0,0000

Análisis de la Varianza

Fuente	Suma de cuadrados	GL	Cuadrado medio	Cociente-F	P-Valor
Modelo	8359,79	1	8359,79	1501,74	0,0000
Residuo	629,042	113	5,56674		
Total (Corr.)	8988,83	114			

Coefficiente de Correlación = 0,964375
R-cuadrado = 93,002 porcentaje
R-cuadrado (ajustado para g.l.) = 92,94 porcentaje
Error estándar de est. = 2,35939
Error absoluto medio = 1,68144
Estadístico de Durbin-Watson = 1,6523 (P=0,0310)
Autocorrelación residual en Lag 1 = 0,169289

Análisis de Regresión - Modelo Lineal $Y = a + b \cdot X$

Variable dependiente: iwm
Variable independiente: H TOTALES

Parámetro	Estimación	Error estándar	Estadístico T	P-Valor
Ordenada	0,0998176	0,171863	0,580797	0,5625
Pendiente	0,00277002	0,000081022	34,1885	0,0000

Análisis de la Varianza

Fuente	Suma de cuadrados	GL	Cuadrado medio	Cociente-F	P-Valor
Modelo	1587,24	1	1587,24	1168,86	0,0000
Residuo	153,447	113	1,35794		
Total (Corr.)	1740,68	114			

Coefficiente de Correlación = 0,954907
R-cuadrado = 91,1847 porcentaje
R-cuadrado (ajustado para g.l.) = 91,1066 porcentaje
Error estándar de est. = 1,16531
Error absoluto medio = 0,836496
Estadístico de Durbin-Watson = 2,05732 (P=0,3800)
Autocorrelación residual en Lag 1 = -0,046809

Análisis de Regresión - Modelo Lineal $Y = a + b \cdot X$

Variable dependiente: lab
Variable independiente: H TOTALES

Parámetro	Estimación	Error estándar	Estadístico T	P-Valor
Ordenada	-1,24914	0,290942	-4,29343	0,0000
Pendiente	0,00529897	0,00013716	38,6335	0,0000

Análisis de la Varianza

Fuente	Suma de cuadrados	GL	Cuadrado medio	Cociente-F	P-Valor
Modelo	5808,42	1	5808,42	1492,55	0,0000
Residuo	439,752	113	3,89161		
Total (Corr.)	6248,17	114			

Coefficiente de Correlación = 0,964168
R-cuadrado = 92,9619 porcentaje
R-cuadrado (ajustado para g.l.) = 92,8996 porcentaje
Error estándar de est. = 1,97272
Error absoluto medio = 1,37903
Estadístico de Durbin-Watson = 1,5993 (P=0,0155)
Autocorrelación residual en Lag 1 = 0,194298

Análisis de Regresión - Modelo Lineal $Y = a + b \cdot X$

Variable dependiente: hl

Variable independiente: H TOTALES

Parámetro	Estimación	Error estándar	Estadístico T	P-Valor
Ordenada	-3,53853	0,673547	-5,25358	0,0000
Pendiente	0,0112236	0,000317179	35,3856	0,0000

Análisis de la Varianza

Fuente	Suma de cuadrados	GL	Cuadrado medio	Cociente-F	P-Valor
Modelo	26025,8	1	26025,8	1252,14	0,0000
Residuo	2307,13	111	20,785		
Total (Corr.)	28332,9	112			

Coefficiente de Correlación = 0,958421
R-cuadrado = 91,8571 porcentaje
R-cuadrado (ajustado para g.l.) = 91,7837 porcentaje
Error estándar de est. = 4,55905
Error absoluto medio = 3,25281
Estadístico de Durbin-Watson = 1,75782 (P=0,0997)
Autocorrelación residual en Lag 1 = 0,118016

Análisis de Regresión - Modelo Lineal $Y = a + b \cdot X$

Variable dependiente: barbillas

Variable independiente: H TOTALES

Parámetro	Estimación	Error estándar	Estadístico T	P-Valor
Ordenada	-0,342816	0,139005	-2,46621	0,0152
Pendiente	0,00195627	0,0000648505	30,1658	0,0000

Análisis de la Varianza

Fuente	Suma de cuadrados	GL	Cuadrado medio	Cociente-F	P-Valor
Modelo	784,18	1	784,18	909,98	0,0000
Residuo	93,9317	109	0,861759		
Total (Corr.)	878,112	110			

Coefficiente de Correlación = 0,945003
R-cuadrado = 89,303 porcentaje
R-cuadrado (ajustado para g.l.) = 89,2049 porcentaje
Error estándar de est. = 0,92831
Error absoluto medio = 0,649092
Estadístico de Durbin-Watson = 1,22219 (P=0,0000)
Autocorrelación residual en Lag 1 = 0,377195

Parámetros del modelo lineal para las medidas de la región cefálica con hl (mm)

Análisis de Regresión - Modelo Lineal $Y = a + b \cdot X$

Variable dependiente: s_b
Variable independiente: hl

Parámetro	Estimación	Error estándar	Estadístico T	P-Valor
Ordenada	-0,203072	0,179779	-1,12957	0,2611
Pendiente	0,264594	0,00828435	31,9391	0,0000

Análisis de la Varianza

Fuente	Suma de cuadrados	GL	Cuadrado medio	Cociente-F	P-Valor
Modelo	1983,59	1	1983,59	1020,10	0,0000
Residuo	215,839	111	1,9445		
Total (Corr.)	2199,43	112			

Coefficiente de Correlación = 0,949666
R-cuadrado = 90,1866 porcentaje
R-cuadrado (ajustado para g.l.) = 90,0982 porcentaje
Error estándar de est. = 1,39445
Error absoluto medio = 0,446612
Estadístico de Durbin-Watson = 1,73542 (P=0,0803)
Autocorrelación residual en Lag 1 = 0,131555

Análisis de Regresión - Modelo Lineal $Y = a + b \cdot X$

Variable dependiente: b_mc
Variable independiente: hl

Parámetro	Estimación	Error estándar	Estadístico T	P-Valor
Ordenada	-0,108823	0,0688156	-1,58137	0,1166
Pendiente	0,315697	0,00317108	99,5551	0,0000

Análisis de la Varianza

Fuente	Suma de cuadrados	GL	Cuadrado medio	Cociente-F	P-Valor
Modelo	2823,79	1	2823,79	9911,21	0,0000
Residuo	31,6248	111	0,284908		
Total (Corr.)	2855,41	112			

Coefficiente de Correlación = 0,994447
R-cuadrado = 98,8925 porcentaje
R-cuadrado (ajustado para g.l.) = 98,8825 porcentaje
Error estándar de est. = 0,533768
Error absoluto medio = 0,285651
Estadístico de Durbin-Watson = 1,6197 (P=0,0214)
Autocorrelación residual en Lag 1 = 0,177937

Análisis de Regresión - Modelo Lineal $Y = a + b \cdot X$

Variable dependiente: s_mc
Variable independiente: hl

Parámetro	Estimación	Error estándar	Estadístico T	P-Valor
Ordenada	-0,238152	0,124452	-1,9136	0,0582
Pendiente	0,559888	0,00573486	97,6289	0,0000

Análisis de la Varianza

Fuente	Suma de cuadrados	GL	Cuadrado medio	Cociente-F	P-Valor
Modelo	8881,64	1	8881,64	9531,41	0,0000
Residuo	103,433	111	0,931829		
Total (Corr.)	8985,07	112			

Coefficiente de Correlación = 0,994228
R-cuadrado = 98,8488 porcentaje
R-cuadrado (ajustado para g.l.) = 98,8385 porcentaje
Error estándar de est. = 0,965313
Error absoluto medio = 0,441236
Estadístico de Durbin-Watson = 2,15152 (P=0,2115)
Autocorrelación residual en Lag 1 = -0,0770556

Análisis de Regresión - Modelo Lineal $Y = a + b \cdot X$

Variable dependiente: iwm
Variable independiente: hl

Parámetro	Estimación	Error estándar	Estadístico T	P-Valor
Ordenada	1,0053	0,0858667	11,7077	0,0000
Pendiente	0,243992	0,00395681	61,6638	0,0000

Análisis de la Varianza

Fuente	Suma de cuadrados	GL	Cuadrado medio	Cociente-F	P-Valor
Modelo	1686,72	1	1686,72	3802,43	0,0000
Residuo	49,2385	111	0,44359		
Total (Corr.)	1735,96	112			

Coefficiente de Correlación = 0,985716
R-cuadrado = 97,1636 porcentaje
R-cuadrado (ajustado para g.l.) = 97,1381 porcentaje
Error estándar de est. = 0,666025
Error absoluto medio = 0,506646
Estadístico de Durbin-Watson = 1,53222 (P=0,0061)
Autocorrelación residual en Lag 1 = 0,198932

Análisis de Regresión - Modelo Lineal $Y = a + b \cdot X$

Variable dependiente: lab
Variable independiente: hl

Parámetro	Estimación	Error estándar	Estadístico T	P-Valor
Ordenada	0,507368	0,0971617	5,22189	0,0000
Pendiente	0,467079	0,00447729	104,322	0,0000

Análisis de la Varianza

Fuente	Suma de cuadrados	GL	Cuadrado medio	Cociente-F	P-Valor
Modelo	6181,19	1	6181,19	10883,02	0,0000
Residuo	63,0442	111	0,567966		
Total (Corr.)	6244,23	112			

Coefficiente de Correlación = 0,994939
R-cuadrado = 98,9904 porcentaje
R-cuadrado (ajustado para g.l.) = 98,9813 porcentaje
Error estándar de est. = 0,753635
Error absoluto medio = 0,501306
Estadístico de Durbin-Watson = 1,44649 (P=0,0014)
Autocorrelación residual en Lag 1 = 0,270333

Análisis de Regresión - Modelo Lineal $Y = a + b \cdot X$

Variable dependiente: barbillas
Variable independiente: hl

Parámetro	Estimación	Error estándar	Estadístico T	P-Valor
Ordenada	0,281727	0,0626888	4,49406	0,0000
Pendiente	0,174175	0,002847	61,1784	0,0000

Análisis de la Varianza

Fuente	Suma de cuadrados	GL	Cuadrado medio	Cociente-F	P-Valor
Modelo	853,507	1	853,507	3742,80	0,0000
Residuo	24,4002	107	0,22804		
Total (Corr.)	877,907	108			

Coefficiente de Correlación = 0,986005
R-cuadrado = 97,2206 porcentaje
R-cuadrado (ajustado para g.l.) = 97,1947 porcentaje
Error estándar de est. = 0,477535
Error absoluto medio = 0,309149
Estadístico de Durbin-Watson = 1,53483 (P=0,0072)
Autocorrelación residual en Lag 1 = 0,216148

