

# PROTOCOLOS PARA EL MUESTREO DE ANGUILA



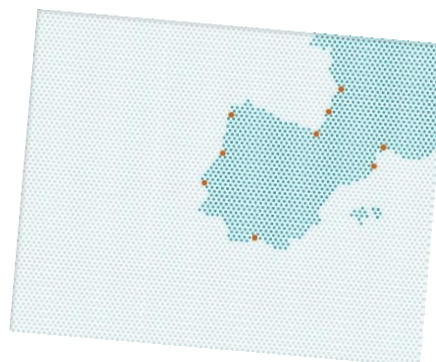
T.M. Portela



I. Domingos



I. Domingos



**Interreg**  
**Sudoe**



EUROPEAN UNION

  
**SUDOANG**



## Tabla de Contenidos

|      |                                                                                                                                         |    |
|------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 1.   | PROTOCOLO PARA EL MUESTREO DE ANGUILA AMARILLA Y ANGUILA PLATEADA EN RÍOS .....                                                         | 7  |
| 1.1. | Calendario del muestreo .....                                                                                                           | 7  |
| 1.2. | Selección del lugar .....                                                                                                               | 7  |
| 1.3. | Longitud del tramo de muestreo .....                                                                                                    | 9  |
| 1.4. | Procedimientos de muestreo .....                                                                                                        | 9  |
| 1.5. | Datos medioambientales que se recopilarán en el campo .....                                                                             | 10 |
| 1.6. | Datos biológicos que se recopilarán en el campo en cada pasada .....                                                                    | 11 |
| 1.7. | Muestras para análisis de laboratorio.....                                                                                              | 12 |
| 1.8. | Material de campo.....                                                                                                                  | 12 |
| 1.9. | <i>R script</i> para identificar la fase de anguila plateada de Durif <i>et al.</i> (2009).....                                         | 13 |
| 2.   | PROTOCOLO PARA LA ESTIMACIÓN DEL RECLUTAMIENTO DE LA ANGULA .....                                                                       | 15 |
| 2.1. | Calendario del muestreo .....                                                                                                           | 15 |
| 2.2. | Selección del lugar .....                                                                                                               | 15 |
| 2.3. | Procedimientos de muestreo .....                                                                                                        | 16 |
| 2.4. | Datos medioambientales que se recopilarán en campo.....                                                                                 | 16 |
| 2.5. | Procedimientos de laboratorio .....                                                                                                     | 17 |
| 2.6. | Equipo de campo .....                                                                                                                   | 17 |
| 2.7. | Fases de pigmentación .....                                                                                                             | 17 |
| 3.   | PROTOCOLO PARA LA PREPARACIÓN DE OTOLITOS Y LECTURA DE LA EDAD .....                                                                    | 21 |
| 3.1. | Extracción y almacenamiento .....                                                                                                       | 21 |
| 3.2. | Desgaste y pulido .....                                                                                                                 | 21 |
| 3.3. | Lectura de la edad .....                                                                                                                | 22 |
| 3.4. | Material .....                                                                                                                          | 22 |
| 4.   | PROTOCOLO PARA LA EVALUACIÓN DE LA INFECCIÓN POR <i>ANGUILICOLA CRASSUS</i> Y EL ÍNDICE DEGENERATIVO DE LA VEJIGA NATATORIA (SDI) ..... | 23 |
| 4.1. | Determinación del nivel individual de infección por <i>Anguillicola crassus</i> .....                                                   | 23 |
| 4.2. | Determinación del Índice Degenerativo de la Vejiga Natatoria (SDI) (modificación del método de Lefebvre <i>et al.</i> , 2002).....      | 24 |
| 5.   | PROTOCOLO DE MUESTREO DE GÓNADAS PARA EVALUAR LA PROPORCIÓN DE SEXOS .....                                                              | 27 |
| 5.1. | Observación macroscópica .....                                                                                                          | 27 |
| 5.2. | Preparación de la muestra para su análisis molecular e histológico.....                                                                 | 29 |
|      | PLANTILLAS para registrar datos de campo y laboratorio.....                                                                             | 31 |



## PREÁMBULO

La evaluación de la población de anguilla europea requiere del uso de métodos estandarizados para mejorar tanto la calidad de los datos como el uso eficiente de los recursos humanos y financieros. Por lo tanto, los siguientes protocolos, desarrollados en el marco de SUDOANG, establecen tales métodos estandarizados para muestrear y analizar la población de anguilla en el área de Sudoe. Algunos de estos protocolos se aplicarán durante los tres años del proyecto para lograr sus objetivos, mientras que otros son un punto de partida para estandarizar los muestreos de anguilla en todos los países y crear una base de referencia para la evaluación de la población en el área de Sudoe.

Esta guía contiene 5 protocolos:

1. Protocolo para el muestreo de anguilla amarilla y anguilla plateada en ríos;
2. Protocolo para la estimación del reclutamiento de la anguilla;
3. Protocolo para la preparación de otolitos y lectura de la edad;
4. Protocolo para evaluar la infección por *Anguillicola crassus* y el índice degenerativo de la vejiga gaseosa (SDI);
5. Protocolo de muestreo de gónadas para evaluar la proporción de sexos.

A pesar de haber sido elaborados en el marco de SUDOANG, estos protocolos también pueden ser implementados fuera del área Sudoe y, por lo tanto, ser útiles para otras agencias encargadas del seguimiento de la población de anguilas y/o para cualquier investigador/a de anguilas.



## 1. PROTOCOLO PARA EL MUESTREO DE ANGUILA AMARILLA Y ANGUILA PLATEADA EN RÍOS

Este protocolo describe las directrices para realizar muestreos con el fin de estimar la densidad de anguilas amarillas y plateadas en cada cuenca fluvial utilizando la pesca eléctrica. Además de presentar los criterios para determinar la ubicación de los lugares de muestreo, este protocolo también define los métodos para recopilarla información biométrica de la anguila, datos de otras especies de peces y variables medioambientales.

Las anguilas amarillas y plateadas capturadas serán trasladadas al laboratorio donde se aplicarán otros protocolos. El protocolo para la preparación de otolitos y determinación de la edad deben ser implementados para conseguir los objetivos de SUDONAG (**obligatorios**), mientras que el *Protocolo para la evaluación de la infección por *Anquillicola crassus** y el *Índice Degenerativo de la Vejiga Natatoria (SDI)* y el *Protocolo para el muestreo de gónadas para evaluar la proporción de sexos*, serán implementados opcionalmente al ser estos **facultativos**.

### 1.1. Calendario del muestreo

El muestreo para estimar la densidad de anguilas amarillas y plateadas debe efectuarse **a finales de verano/principios de otoño** para asegurar la captura de anguilas plateadas. Se espera por lo tanto que, dependiendo de la ubicación (latitud) de la cuenca, el muestreo se efectúe cuando las anguilas ya se encuentren en la fase plateada, **PERO** antes de su escape, que se produce en otoño/invierno.

### 1.2. Selección del lugar

El muestreo se realizará mediante pesca eléctrica en cada cuenca piloto, sólo en agua dulce, tanto en el río principal como en sus afluentes (hasta los afluentes de tercer orden). El **tramo que será objeto de muestreo debe ser representativo del segmento del río**, cubriendo la diversidad física existente y conteniendo al menos una zona de rápidos en caso de existir una en el segmento. Para facilitar la comprensión, se presenta tanto una representación esquemática como las definiciones de los términos.

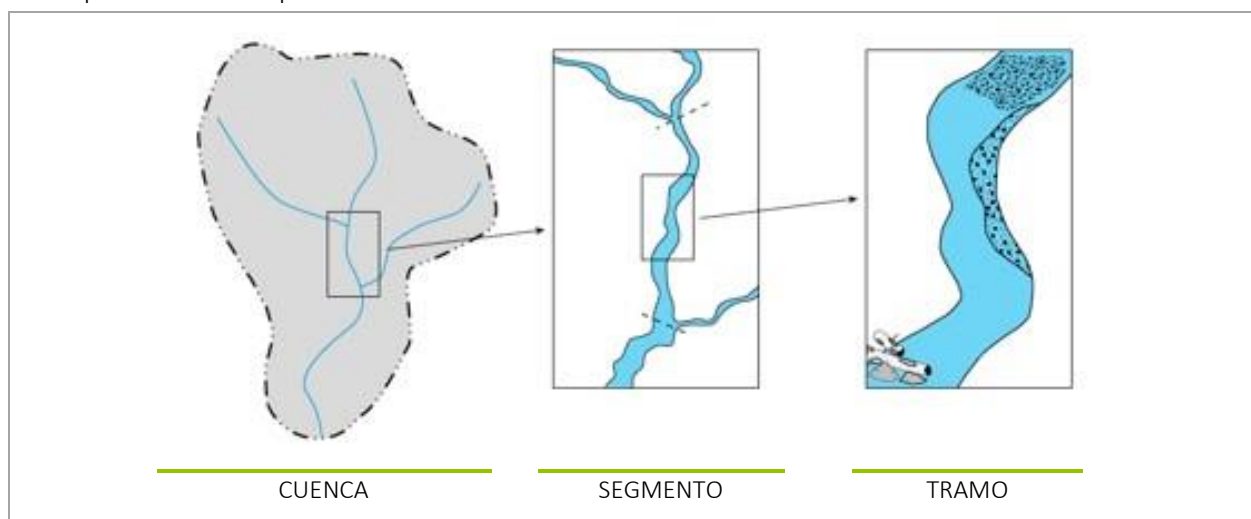


Figura 1. Representación esquemática de los términos utilizados en el protocolo.

**CUENCA:** La cuenca hidrográfica completa.

**SEGMENTO:** Sección de un río en la cuenca con características bióticas y físicas similares (por ejemplo gradiente y caudal similares).

**TRAMO:** Una sección de un río comprendida en un segmento en la que se recopilarán datos biológicos.

Se deben obtener imágenes de cada tramo de muestreo, así como su localización (coordenadas mediante un GPS) con el fin de que puedan ser reconocidos.

A continuación, se presenta un posible criterio para **definir** el número y la ubicación de lugares de muestreo que sean representativos del segmento del río. Deben seguirse los siguientes pasos:

#### 1. Dividir la cuenca fluvial en segmentos hidrológicos

- Se utilizarán los cambios de gradiente, caudal (confluencias de afluentes) y/o alteraciones (embalses) para establecer segmentos;
- Si el tipo de gradiente se repite, se utilizará el segmento de mayor longitud o el que represente mejor el gradiente aguas abajo del río;
- Si el gradiente del río es muy bajo, se utilizarán los cambios de caudal (confluencias de afluentes) para designar segmentos;
- Si el gradiente es bajo y no hay afluentes, se establecerán los segmentos situándolos a distancias iguales entre sí;
- No deben asignarse segmentos en embalses.

#### 2. Medir cada segmento hidrológico

- Los segmentos de más de 10 km de longitud pueden dividirse según la pendiente en mínimo, medio y máximo.
  - La pendiente indica el gradiente del río, que influye a su vez en el transporte de sedimentos y las características de la descarga
  - La pendiente se define como la diferencia de elevación en los extremos de aguas arriba ( $Elv_{Upstr}$ ) y de aguas abajo ( $Elv_{Dowstr}$ ) de un segmento del río, dividida por la longitud de ese segmento ( $Length_{seg}$ ):

$$\frac{(Elv_{Upstr} - Elv_{Dowstr})}{Length_{seg}}$$



### 3. Ubicación de los tramos de muestreo en un segmento

- Deberá establecerse un tramo en el centro de un segmento de un gradiente o caudal, debiendo ser representativo de dicho segmento.

- Si un **segmento tiene menos de 60 km de longitud**, el número de tramos debería ser el siguiente:

| Longitud        | Número de tramos |
|-----------------|------------------|
| 30-60 km        | 3                |
| 11-29 km (< 30) | 2                |
| 1-9 km (< 10)   | 0 - 1            |

- Si el **segmento tiene una longitud de 60 km o mayor**, establecer un tramo por cada 20 km de la siguiente manera:

| Longitud | Número de tramos |
|----------|------------------|
| 60 km    | 3                |
| 80 km    | 4                |
| 100 km   | 5                |

### 1.3. Longitud del tramo de muestreo

La escala espacial es un aspecto esencial en cualquier protocolo de muestreo. Independientemente del lugar en el que se realice el muestreo, en ese tramo del río deberían capturarse la mayoría de las especies que probablemente estén presentes dentro de los límites del campo eléctrico. Para estandarizar el protocolo de pesca es necesario definir la longitud del tramo objeto de muestreo. Deben adoptarse las siguientes longitudes:

| Tipo de río     | Longitud del tramo                 | Mínima | Máxima |
|-----------------|------------------------------------|--------|--------|
| Río vadeable    | 20 veces la anchura mojada del río | 100 m  | 300 m  |
| Río no vadeable | 10 veces la anchura mojada del río | 300 m  | 500 m  |

### 1.4. Procedimientos de muestreo

El muestreo de peces debe efectuarse mediante pesca eléctrica. La conductividad determinará el ajuste inicial del potencial que se seleccione. Se recomienda seleccionar los siguientes potenciales como valores máximos, dependiendo de la conductividad del agua: **400 V** para **conductividad alta** (> 300  $\mu\text{S}/\text{cm}$ ); **800 V** para **conductividad media** (100 - 300  $\mu\text{S}/\text{cm}$ ); **1.000 V** para **conductividad baja** (< 100  $\mu\text{S}/\text{cm}$ ).

- Es preferible contar con un equipo de al menos cuatro (4) personas. Un (1) operario que manipule el ánodo y otros tres (3) que lleven sacaderas auxiliares para recoger los peces aturdidos o que escapen y depositarlos en un cubo. Los peces deben retirarse lo antes posible del campo eléctrico.

- Se recomienda utilizar **corriente continua directa** (DC), ya que es mucho menos nociva para los peces y es necesario reducir la mortalidad y las lesiones de los peces al nivel más bajo posible (el potencial y la intensidad deben registrarse).
- Durante el **barrido del tramo**, la pesca debería efectuarse dejando el **ánodo en el agua durante 30 segundos**, O, en las áreas de gran densidad, dejando el ánodo hasta que los peces sean atraídos; el ánodo debería moverse de manera circular ( $\sim 1$  m de diámetro). La luz de malla del ánodo debe ser lo suficientemente pequeña (1-2 mm x 1-2 mm) para retener anguilas de todo el rango de tamaños.
- En cada tramo de muestreo deben efectuarse **al menos dos pasadas** con un **intervalo de 30 minutos entre ellas**. Si en la **segunda pasada se capturan más ejemplares** que en la primera, **es necesario efectuar una tercera pasada**, dejando transcurrir también en este caso un intervalo de 30 minutos entre pasadas. La cantidad de anguilas capturadas en cada pasada debe ser registrada por separado.
- **Después de cada pasada** se deben **medir y pesar** todas las anguilas capturadas lo antes posible. Debería identificarse la captura incidental y registrarse su número. Todos los individuos capturados en las pasadas sucesivas deberían mantenerse en un contenedor situado en el río (equipado con una tapa y con pequeñas aberturas que permitan la renovación del agua pero eviten la fuga de los peces) hasta el final del muestreo, y sólo deberían devolverse al río después de la última pasada.
- Independientemente de la profundidad del tramo, la pesca **SIEMPRE debe efectuarse en dirección aguas arriba**. Sin embargo, la pesca puede efectuarse de maneras diferentes dependiendo de la profundidad del río:

#### En los ríos poco profundos ( $< 0,8$ m de profundidad)

- En los **ríos estrechos** (anchura  $< 15$  m), la pesca debe efectuarse en la anchura completa del río, con el objetivo de incluir las dos orillas y el centro del río. Sin embargo, en los **ríos anchos** (anchura  $\geq 15$  m), los operarios deben caminar lentamente siguiendo el curso aguas arriba, trazando un zigzag entre las dos orillas, cubriendo todos los hábitats existentes y capturándolos peces que hayan buscado refugio.

#### En los ríos profundos ( $\geq 0,8$ m de profundidad)

- La pesca eléctrica SÓLO se efectuará en las orillas, ya que la eficiencia se reduce en gran medida en las zonas más profundas, especialmente si la especie que se desea capturar es bentónica, como es el caso de la anguila.
- La pesca eléctrica mediante vadeo se limita a la profundidad a la que el vadeo pueda efectuarse en condiciones seguras. No se recomienda sumergir el cabezal del ánodo más allá de la profundidad en la que deje de verse.

### 1.5. Datos medioambientales que se recopilarán en el campo

Durante el muestreo deben medirse y registrarse los siguientes parámetros **cada vez que cambie el hábitat**:

- Profundidad (m);
- Velocidad de la corriente (m/s);
- Temperatura del agua ( $^{\circ}\text{C}$ );

- Conductividad ( $\mu\text{S}/\text{cm}$ );
- Oxígeno disuelto ( $\text{mg}/\text{L}$  O %);
- También debe registrarse el tipo de **sustrato** y de **vegetación en los márgenes** y la **cobertura dentro de la corriente** (formato y clases en plantilla de Datos);
- También deberían registrarse la **superficie** muestreada ( $\text{m}^2$ ) y el **tiempo de muestreo** (minutos).

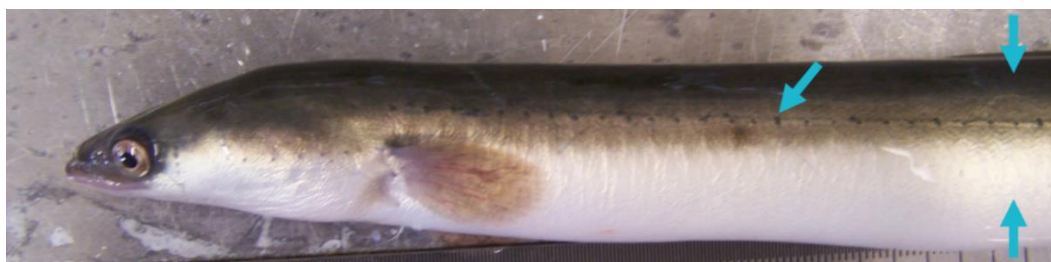
### 1.6. Datos biológicos que se recopilarán en el campo en cada pasada

Los datos que se indican a continuación deben recopilarse en el campo para cada anguila:

- Longitud total (mm);
- Peso total (0,01 g);
- Identificación de la fase (amarilla o plateada) mediante:

#### 1. Inspección visual:

- presencia de una línea lateral visible;
- color del cuerpo y contraste entre las partes dorsal y ventral.



#### 2. Para todos los peces de más de 300-350 mm de longitud total, debe medir:

- Longitud de la aleta pectoral;
- Diámetros vertical y horizontal del ojo (siempre el **ojo izquierdo**, a menos que tuviera alguna malformación o defecto. Si fuera así, la medición debería realizarse sobre el ojo derecho, pero es necesario que esta información sea anotada en el campo de observaciones).

El límite de 300/350 mm debe ajustarse de acuerdo con la latitud. Corresponde al límite inferior de tamaño plateado para las anguilas en el rango sur.

- Para confirmar la fase de anguila plateada, debe utilizarse la clasificación de Durif *et al.*, (2009). El **script R** para calcular/identificar la fase de anguila plateada se encuentra al final del protocolo.



- El resto de los peces de otras especies distintas a la anguila que se hayan capturado accidentalmente también deben ser identificados y contados (especies de peces y *Procambarus clarkii*) en cada pasada.

## 1.7. Muestras para análisis de laboratorio

### Protocolo obligatorio

Para cumplir con los objetivos propuestos en el proyecto SUDOANG, deben capturarse y analizarse en el laboratorio para determinar la edad (*Protocolo para la preparación de otolitos y lectura de la edad*) **20 anguilas plateadas y 60 anguilas amarillas/cuenca piloto/año**. La **muestra de anguilas amarillas** deberá **estratificarse** con el fin de cubrir todos los tamaños e incrementar por lo tanto la diversidad de edades. Esas anguilas amarillas deben capturarse en los tramos bajo, medio y alto de la cuenca (10 anguilas de cada zona = 60 anguilas) y deben ser representativas de los tamaños de cada zona.

### Protocolos facultativos

Si van a aplicarse otros protocolos (*Protocolo para la evaluación de la infección por *Anquilicola crassus* y el Índice Degenerativo de la Vejiga Natatoria (SDI)* y *Protocolo para el muestreo de gónadas para evaluar la proporción de sexos*), las anguilas deben analizarse lo antes posible (preferiblemente mientras aún estén frescas).

Para reducir el sacrificio de animales, las anguilas capturadas para determinar la edad también deben utilizarse para el análisis de la infección por *Anquilicola crassus*, mientras que para la evaluación de la proporción de sexos (análisis molecular e histológico) solo deben utilizarse anguilas que no tengan una apariencia de macho o hembra típica.

Tanto la identificación de cada anguila que se lleve al laboratorio como el lugar de muestreo deben registrarse y mantenerse sin cambios para todos los análisis. Debe existir un código único para cada ejemplar.

## 1.8. Material de campo

- Dispositivo de pesca eléctrica (hasta 1.000 V) y generador o baterías
- Ánodo y cátodo;
- Guantes de goma;
- Botas para vadear;
- Sacaderas auxiliares;
- Contenedores (por ejemplo cubos) para mantener los peces capturados;
- Regla y balanza;
- Balanza de precisión;
- Sonda multiparamétrica;
- Medidor de corriente;
- GPS y cámara fotográfica;
- Calibre digital.

### 1.9. R script para identificar la fase de anguila plateada de Durif et al. (2009)

El proyecto [stacom](#) es un paquete de acceso abierto (base de datos Postgres, JAVA, R) para tratarla información de monitoreo de la migración. Uno de los métodos de clase desarrollados en este paquete permite calcular las fases de Durif.

Esta clase contiene un conjunto de datos con coeficiente de Durif, y usted puede utilizar una función interna del paquete para calcular la fase. Para utilizar la función `fun_stage_durif`, tiene que crear un conjunto de datos con columnas.

Longitud corporal **BL** (mm)

Peso **W** (g)

Diámetro vertical del ojo **Dv** (mm)

Diámetro horizontal del ojo **Dh** (mm)

Longitud de la aleta pectoral **FL** (mm)

```
requiere(stacomR)

# Cargar los coeficientes de Durif
datos("coef_durif")

#####
# Para utilizar la función fun_stage_durif manually
# crear una matriz con columnas BL, "W", "Dv", "Dh", "FL"
#####
# aquí se ha extraído de los datos disponibles
anguila_plateada<-as.matriz(r_silver@calcddata[[1]][,c("BL","W","Dv","Dh","FL"
)])
cabeza(anguila_plateada) # para ver las primeras líneas
#>      BL      W      Dv      Dh      FL
#> 25710 830 1074  8.14  8.70 39.79
#> 25711 714  740  8.24  8.52 38.04
#> 25712 720  755  6.92  6.87 34.01
#> 25713 860 1101 10.53 10.43 44.47
#> 25714 716  752  7.42  8.76 33.78
#> 25715 690  622  7.83  9.25 29.58
fase <- fun_stage_durif(anguila_plateada) # aplicar la función a la matriz
fase[1:10] # Ver los primeros 10 elementos en vector plateada
#> 25710 25711 25712 25713 25714 25715 25716 25717 25718 25719
#> "FIII" "FIII" "FIII" "FIV" "FIII" "FIII" "FV" "FV" "FIII" "FIII"
```

### Referencias

Durif C., Guibert, A. y Pierre, E. (2009). *Morphological discrimination of the silvering stages of the European eel*. In J. M. Casselman & D. K. Cairns (Eds.), *Eels at the Edge. Science, Status, and Conservation Concerns* (pp. 103–111). Bethesda, MA: American Fisheries Society Symposium 58.



## 2. PROTOCOLO PARA LA ESTIMACIÓN DEL RECLUTAMIENTO DE LA ANGULA

El objetivo de este protocolo consiste en elaborar un método estándar para calcular el índice de reclutamiento de la angula utilizando un aparejo de pesca (una red o una trampa), preferiblemente en la desembocadura del río, es decir, sin la influencia de presiones antropogénicas. Este método también pretende proporcionar una estimación cuantitativa del reclutamiento de la angula para cada cuenca hidrográfica de manera que puedan compararse los niveles de reclutamiento entre cuencas fluviales. Se espera que el uso de este protocolo pueda extenderse a otras cuencas hidrográficas en el espacio SUDOE, con el fin de disponer de un índice de reclutamiento nacional.

Las condiciones de las diez cuencas fluviales cubiertas por SUDOANG son diferentes. Las cuencas fluviales en contacto con el océano Atlántico están fuertemente influenciadas por las mareas. En el mar Mediterráneo, por el contrario, las mareas son muy débiles y las angulas se introducen en los ríos migrando contra la corriente. Por lo tanto, los métodos para el muestreo de angulas y la estimación del reclutamiento deben ajustarse a las condiciones locales. Sin embargo, con independencia del método seleccionado para el muestreo de angulas, el objetivo consiste en registrar/obtener un número de angulas por volumen de agua (en el caso de las cuencas fluviales influenciadas por la marea) o sección transversal (en el caso de las cuencas fluviales que desembocan en el Mediterráneo).

Las angulas utilizan el transporte selectivo mareal para ahorrar energía. Debido a ello, en la costa atlántica, en la que existe la influencia de la marea, las angulas deben capturarse durante la subida de la marea. En el Mediterráneo, en el que la marea influye mucho menos en la actividad de las angulas, el viento desempeña un papel importante en el proceso de reclutamiento.

### 2.1. Calendario del muestreo

La pesca debería efectuarse **mensualmente** durante el **período de migración más intenso** (lo ideal son 6 meses). El muestreo debe efectuarse en los **días de luna nueva**. Si las condiciones meteorológicas no son favorables para la pesca, ésta puede efectuarse durante un máximo de 2 días a partir del día de luna nueva. En las cuencas piloto que desembocan en el Atlántico, el muestreo siempre debe efectuarse durante la subida de la **maree nocturna**. En las cuencas que desembocan en el Mediterráneo, el muestreo debe efectuarse a horas similares de la noche o en el período próximo al nivel máximo del agua si se considera que esas condiciones influyen en las capturas. En cualquier caso, el protocolo de muestreo debe ajustarse después de los experimentos iniciales durante el primer año y mantenerse a largo plazo para asegurar la recopilación normalizada de datos para conseguir una serie de reclutamiento.

### 2.2. Selección del lugar

El **lugar de pesca** debe estar lo más cerca del mar posible, con el fin de evitar la posible influencia de otros pescadores, si existe una actividad pesquera en ese lugar.

### 2.3. Procedimientos de muestreo

- El aparejo de pesca debe ser preferiblemente el que utilicen los pescadores u otro que ya se haya utilizado;
- Debe utilizarse un tamiz para separar las angulas de otros organismos;
- Si se capturan 50 o menos angulas, todas ellas deben llevarse al laboratorio. Si se capturan más de 50 angulas, debe retenerse una submuestra de 50 angulas para su análisis;
- Los parámetros del agua deben medirse al principio y al final de cada período de pesca. Si la pesca se efectúa de manera continua, bastará con dos registros (al comienzo y al final de la pesca). Si el muestreo se efectúa de manera repetida, deben registrarse mediciones a intervalos regulares (es decir, en cada ocasión en la que se efectúe un muestreo).
- En el **área Atlántica**:
  - El muestreo debe iniciarse cuando la marea comienza a subir y prolongarse hasta que se llegue a la pleamar;
  - Es necesario registrar el valor del flujómetro al comienzo y al final del muestreo;
  - Debe registrarse el número de angulas por volumen de agua;
  - Si la pesca es continua durante toda la marea creciente, es necesario registrar el valor del flujómetro al comienzo y al final del muestreo, así como el número de angulas por volumen de agua.
  - Si el muestreo puede efectuarse de manera repetida a intervalos regulares durante toda la marea creciente, debe registrarse por separado el valor del flujómetro al comienzo y al final de cada ocasión. Las angulas también deben recogerse y guardarse por separado en cada ocasión;
  - Al final de la pesca, las 50 angulas que se retendrán para el análisis de laboratorio deben estar distribuidas por igual con respecto a los intervalos de muestreo;
  - Debe indicarse la sección transversal del río y la velocidad media del agua con el fin de calcular el volumen total de agua que fluye en el río.
- En el **área Mediterránea**:
  - El muestreo debe tener la duración suficiente para cubrir el pico de migración nocturno;
  - Si se utiliza un garlito (u otro aparejo de muestreo similar), debe registrarse la superficie transversal muestreada mediante esta nasa, y también debe medirse la sección transversal total del río en la ubicación de la nasa. Si fuera posible, pueden efectuarse experimentos de marcado y recaptura para determinar la eficacia de la trampa;
  - Si se utiliza una escala para peces, es necesario evaluar la eficacia de la escala, bien sea efectuando experimentos de marcado y recaptura o arrastrando la red en oblicuo con el fin de obtener una medición de la densidad de angulas en el agua (protocolo similar al de la zona Atlántica).

### 2.4. Datos medioambientales que se recopilarán en campo

Deben registrarse las siguientes variables medioambientales:

- Fecha y hora de la pesca;
- Hora y altura de la marea;
- Profundidad;



- Temperatura del agua y salinidad o conductividad (agua salobre o agua dulce) – mediante registradores de datos o botellas Van Dorn/botellas Niskin;
- Fecha del día de Luna Nueva;
- Caudales en la anchura del río y en las ubicaciones de las nasas;
- Duración del período de pesca.

## 2.5. Procedimientos de laboratorio

Las muestras llevadas al laboratorio deben mantenerse en agua en el frigorífico, para ser analizadas lo antes posible.

En el laboratorio, las angulas deben depositarse sobre papel con el fin de eliminar el exceso de agua, y deben registrarse los datos siguientes:

- Longitud individual (mm);
- Peso individual (0,01 g);
- Fase de pigmentación (de acuerdo con la clasificación de Briand, 2009).

## 2.6. Equipo de campo

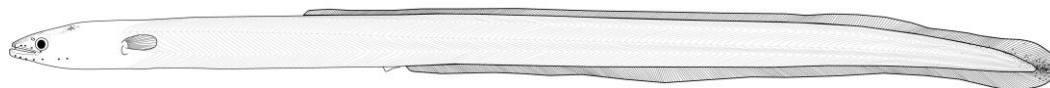
- Red/nasa;
- GPS;
- Flujómetro;
- Tamiz;
- Botellas Van Dorn o Niskin o registrador de datos.

## 2.7. Fases de pigmentación

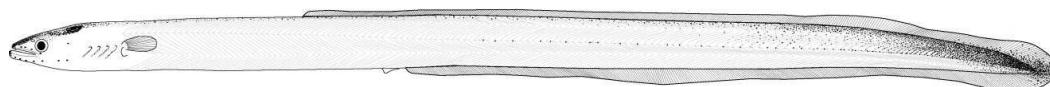
Para la identificación de las fases de pigmentación, debe aplicarse la clasificación de Briand (2009).

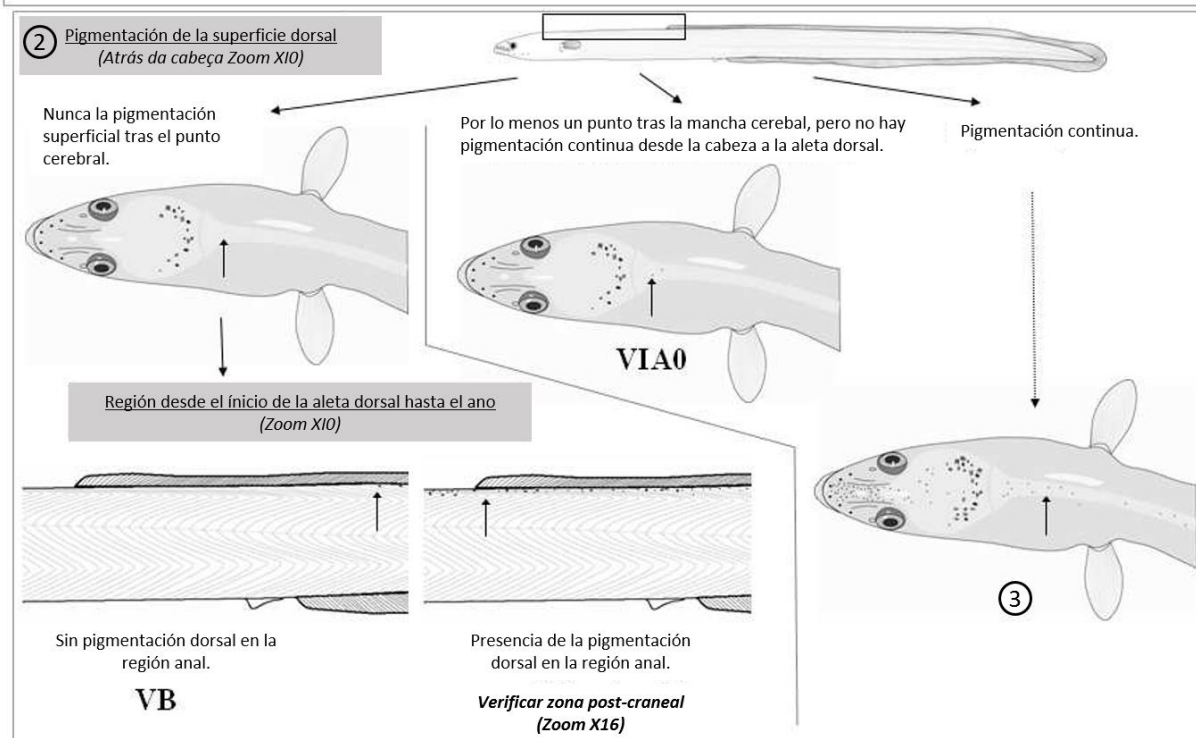
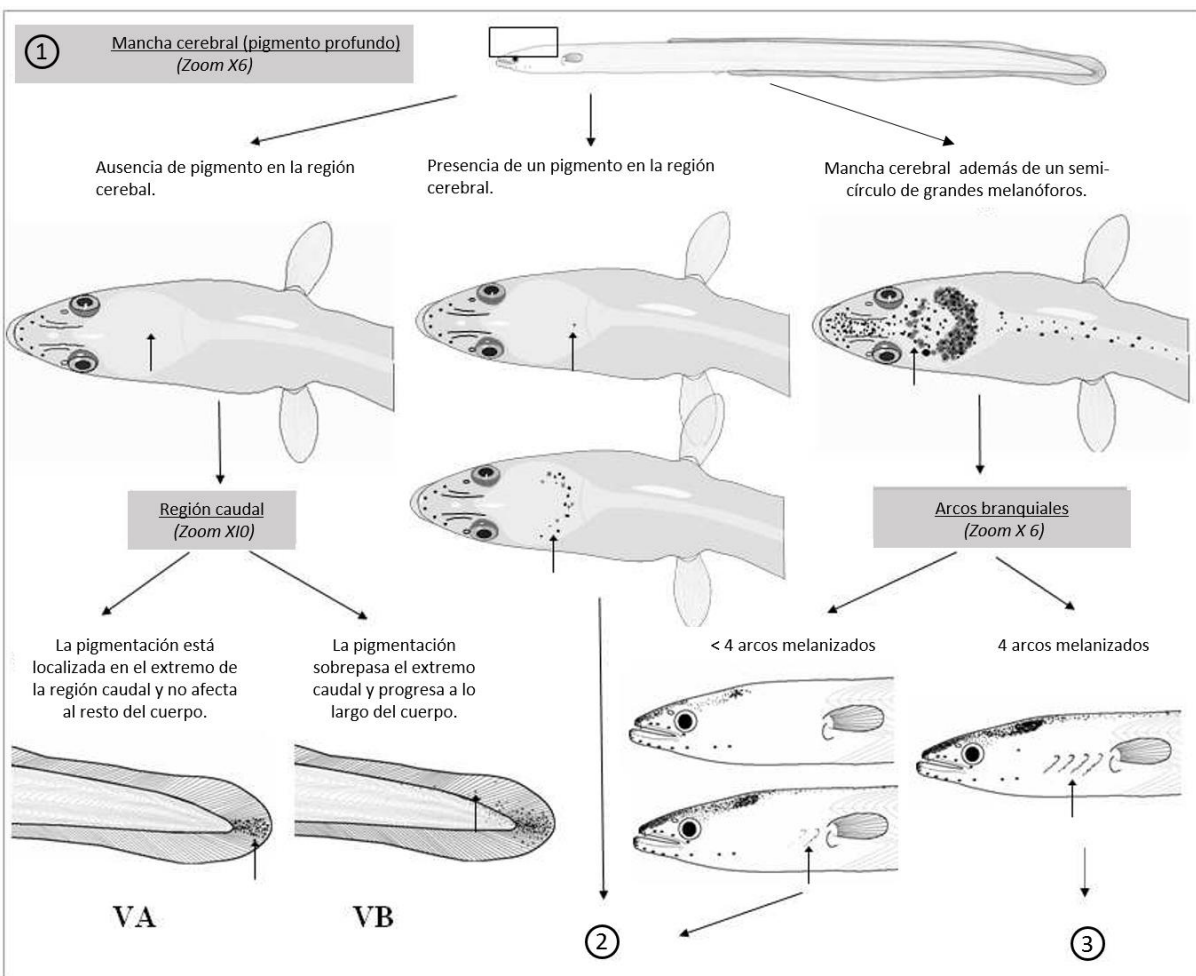
de (Strubberg, 1913; Elie et al., 1982; Lecomte-Finiger, 1983).

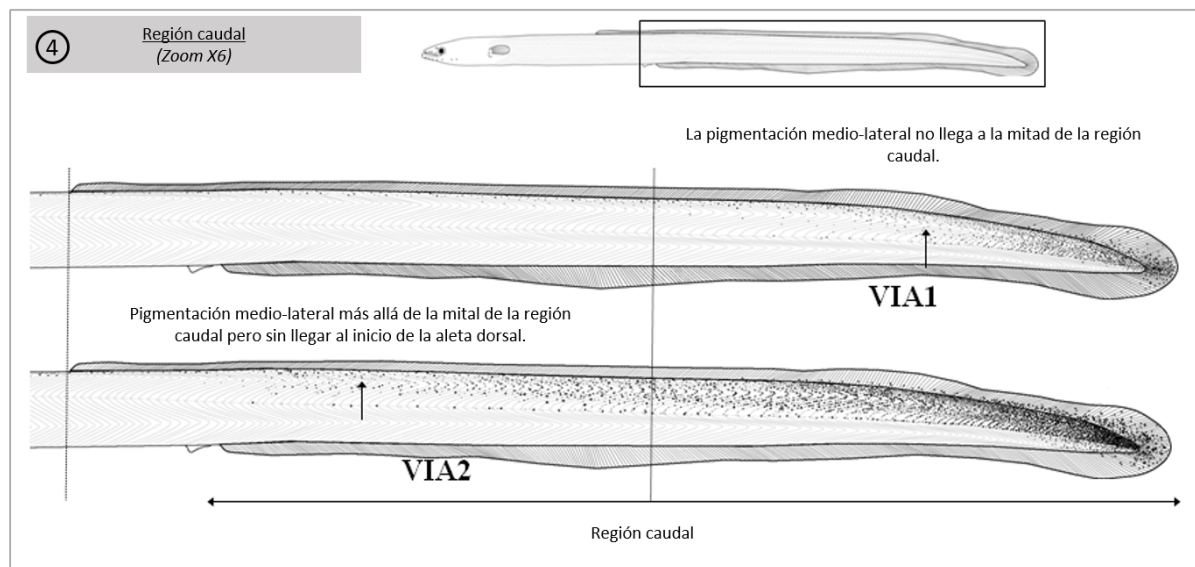
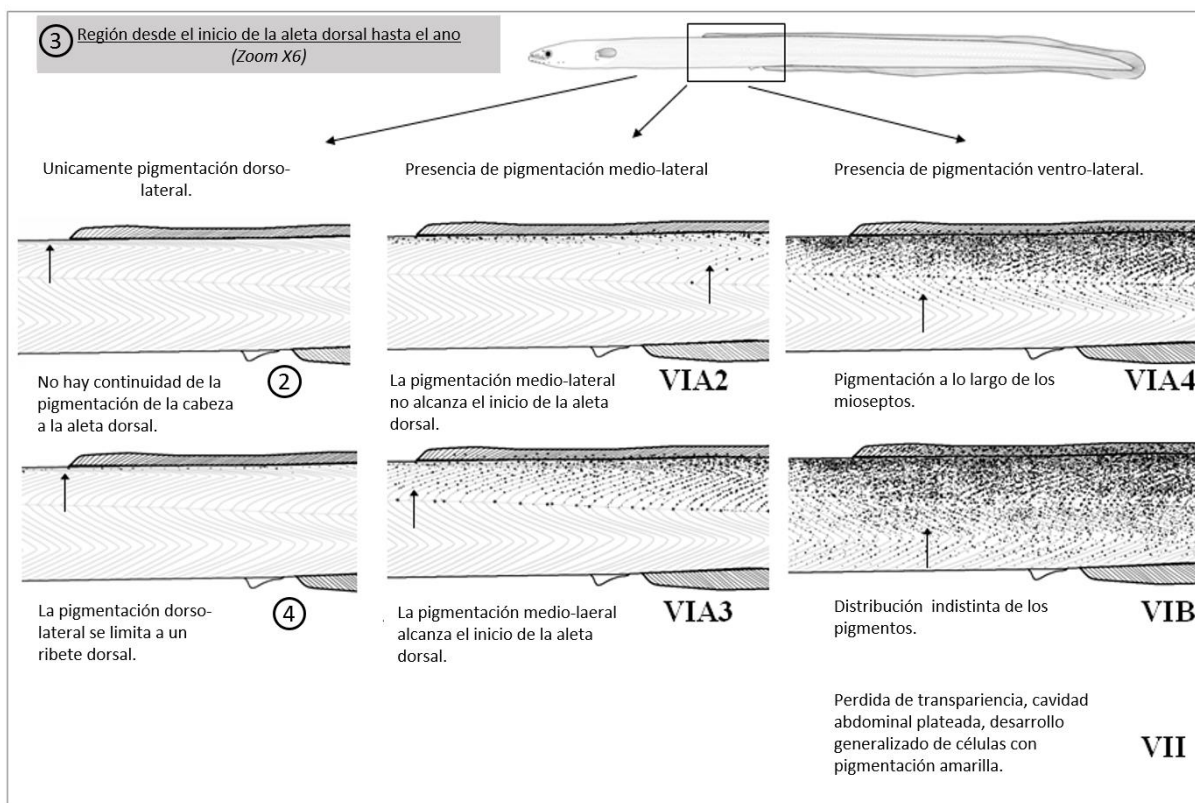
VB



VIA2







## Referencias

- Briand C. 2009. *Dynamique de population et de migration des civelles en estuaire de Vilaine*. Tesis doctoral, Agrocampus Ouest. Rennes, Francia. 207p.
- Elie P., R. Lecomte-Finiger, I. Cantrelle y N. Charlon. 1982. *Définition des limites des différents stades pigmentaires durant la phase civelle d'Anguilla anguilla L.* Vie et Milieu 32: 149–157.
- Lecomte-Finiger R. 1983. *Contribution à la connaissance de l'écobiologie de l'anguille, Anguilla anguilla, L. 1758, des milieux lagunaires méditerranéens du golfe du Lion: Narbonnais et Roussillon*. Tesis doctoral, Université de Perpignan, Francia.
- Strubberg A.C. 1913. *The metamorphosis of elvers as influenced by outward conditions*. Meddelester fra Kommissionen for Havundersøgesler, serie Fiskeri Copenhagen 4: 1–11.



### 3. PROTOCOLO PARA LA PREPARACIÓN DE OTOLITOS Y LECTURA DE LA EDAD

Este protocolo se ha elaborado con el fin de armonizar las metodologías para la preparación de otolitos y la lectura de la edad del individuo en el marco del proyecto SUDOANG. Se basa en el *Manual on Age reading* (Manual sobre la lectura de la edad) (ICES 2009). El sexo de los individuos debe identificarse mediante análisis macroscópico (Véase *Protocolo para el muestreo de gónadas para evaluar la proporción de sexos*).

#### 3.1. Extracción y almacenamiento

- Extraer los dos otolitos sagitales de cada anguila;
- Limpiarlos con agua y secarlos;
- Almacenar los otolitos en seco en contenedores pequeños (por ejemplo, *eppendorfs*), asegurándose de que estén totalmente secos con el fin de evitar su deterioro. Se deben guardar a temperatura ambiente.

#### 3.2. Desgaste y pulido

- Seleccione el otolito derecho para mayor coherencia en la comparación. Si no fuera posible, seleccione el izquierdo, pero incluya esta información en las observaciones.
- Los otolitos pueden observarse enteros (sin preparación) con luz transmitida intensa o sobre una superficie oscura con luz incidente intensa. Si hay menos de 4 a 5 marcas anuales, la edad es correcta y no se requiere ninguna otra preparación; excepto sumergirlos en etanol 96% para mejorar la visualización de las marcas de crecimiento.
- Si la edad es más de 5 años, los otolitos deben incluirse en resina;
- Las secciones sagitales se obtienen incluyendo directamente el otolito en resina, mientras que la sección transversal requiere que el otolito quede inmerso en medio del bloque de resina.
- El proceso de desgaste debe controlarse cuidadosamente hasta que se haya alcanzado el plano medio del otolito. Esto se lleva a cabo examinando el otolito bajo un microscopio de disección estereoscópico, con el mayor aumento posible, utilizando diversos tipos de luz, incluyendo luz transmitida, reflejada o polarizada.
- El otolito se esmerila hasta el plano sagital (si la anguila tiene hasta 12 años y el otolito no es curvo) o el transversal (en este caso se requiere un corte de otolito a lo largo del eje transversal con una sierra de diamante) (, dependiendo por lo tanto del tamaño del otolito y su curvatura) hasta alcanzar el centro del otolito
- El pulido puede efectuarse manualmente, o utilizando una amoladora en conjunción con papel abrasivo de carburo de silicio, lubricada con agua destilada.
- Pulir la superficie esmerilada del otolito utilizando paños de pulido, pasta de polvo de diamante (o aluminio) o papeles abrasivos en seco/húmedo de carburo de silicio en orden de rugosidad decreciente (grano 1200-4000), lubricada con agua destilada.

Para una información más detallada sobre los procedimientos, consulte el *Manual for Age Reading of Atlantic Eel* (puede encontrar un enlace al documento más adelante en la bibliografía).

### 3.3. Lectura de la edad

- Después de la preparación, se deben obtener una imagen de cada otolito con el fin de facilitar el intercambio entre todos los lectores.
- Las secciones sagitales precisan de aplicación de ácido y tinción para potenciar las marcas de invierno. Las secciones transversales no requieren de este proceso;
- Proceder a la lectura de la edad contando el número de marcas de invierno. Cuando se observa el otolito con **luz transmitida** las zonas traslúcidas (invierno) son brillantes, mientras que las zonas opacas (verano) son oscuras. Si se observan con luz reflejada, las zonas opacas (verano) son brillantes y las zonas traslúcidas (invierno) son oscuras.

### 3.4. Material

- Microscopio de disección estereoscópico (con cámara digital y software de captura y análisis de imágenes Image J);
- Portaobjetos de cristal;
- Pinzas de punta fina;
- Agujas montadas;
- Caja para portaobjetos.
- Reactivos necesarios para la preparación:
  - Cera, resina epóxica, para incluir el otolito;
  - Pasta de polvo de aluminio o diamante para pulir el otolito.

### Referencias

[ICES. 2009. Workshop on Age Reading of European and American Eel \(WKAREA\). Burdeos, Francia: ICES CM 2009\ACOM: 48, 66 pp.](#)  
[ICES 2009. Manual for the Ageing of Atlantic Eel. En Workshop on Age Reading of European and American Eel, \(WKAREA\) Annex 4, 57 pp.](#)

## 4. PROTOCOLO PARA LA EVALUACIÓN DE LA INFECCIÓN POR *ANGUILLICOLA CRASSUS* Y EL ÍNDICE DEGENERATIVO DE LA VEJIGA NATATORIA (SDI)

1. Intente no abrir la vejiga natatoria al retirarla de la anguila;
2. La vejiga natatoria está formada por 2 capas (con cierto parecido a unos calcetines) y tenemos que analizar la dos juntas;
3. Coloque la vejiga natatoria en una placa de Petri con agua salada (8g/L);
4. Eche un primer vistazo a la vejiga natatoria sin abrirla para hacerse una idea de la transparencia-opacidad (para la determinación posterior del SDI).
5. Abra la vejiga natatoria a lo largo del eje longitudinal con unas tijeras pequeñas (efectuando el corte con la menor profundidad posible con el fin de no dañar los parásitos) de un extremo a otro (esté atento puesto que algunos parásitos pequeños pueden ocultarse en la parte inferior de uno de los extremos). Abra también el canal entre las dos glándulas gaseosas (allí pueden ocultarse larvas).
6. Esté atento mientras corta la vejiga natatoria por si rezuma exudado (los trozos de gusanos muertos, los eritrocitos, el tejido de la vejiga natatoria en descomposición y los huevos y las larvas L2 de *A. crassus* deben considerarse exudado);
7. Para determinar el Índice Degenerativo de la Vejiga Natatoria (SDI), es necesario contar con un microscopio estereoscópico y un calibre.

### 4.1. Determinación del nivel individual de infección por *Anguillicola crassus*

Puede procederse de dos maneras:

- 1) la primera y la más rápida y sencilla: simplemente retire los parásitos y cuéntelos (pero sin el microscopio estereoscópico no contabilizará los más pequeños (las larvas, por ejemplo)).
- 2) la segunda manera es un poco más difícil y requiere más tiempo, pero permite evaluar mejor el posible impacto de *A. crassus*: identifique las etapas de desarrollo y determine el sexo de los adultos si fuera posible (es necesario estirar la pared de la vejiga natatoria y utilizar un microscopio estereoscópico para contabilizar todos los parásitos).

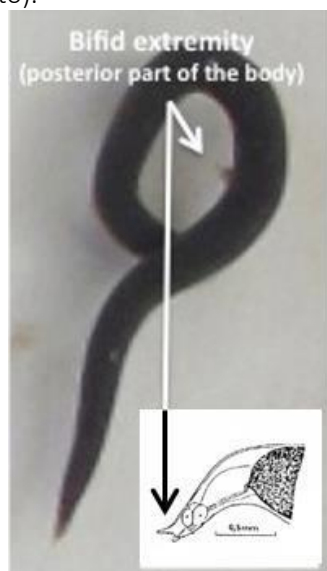
### Infección por *Anguillicola crassus*

- 1) Retirada y recuento de los parásitos sin microscopio estereoscópico (se subestima la infección).





2) Retirada y recuento de los parásitos con microscopio estereoscópico (se tienen en cuenta todas las fases del parásito).



Macho



Hembra



Larva L3 (1) y larva L4(2)



Larva L3



Larva L4

#### 4.2. Determinación del Índice Degenerativo de la Vejiga Natatoria (SDI) (modificación del método de Lefebvre *et al.*, 2002)

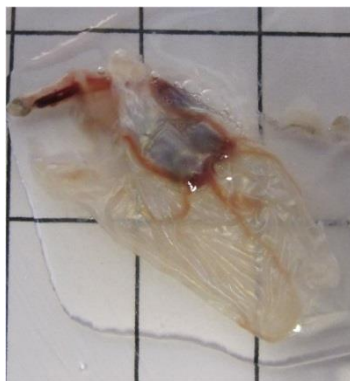
Basado en tres criterios, con el código 0, 1 o 2 (degradación cada vez mayor)

##### 1) Transparencia-Opacidad de la vejiga natatoria

Necesita un papel que tenga líneas impresas claramente marcadas. Aplane la vejiga natatoria sobre el papel y si:

- Puede ver las líneas a través de la vejiga natatoria sin aumento (luz natural): puntuación 0
- Si no puede ver nada con la luz transmitida del microscopio estereoscópico: puntuación 2
- Si no puede ver las líneas con luz natural y sin aumento, pero sí puede verlas con la luz transmitida: puntuación 1

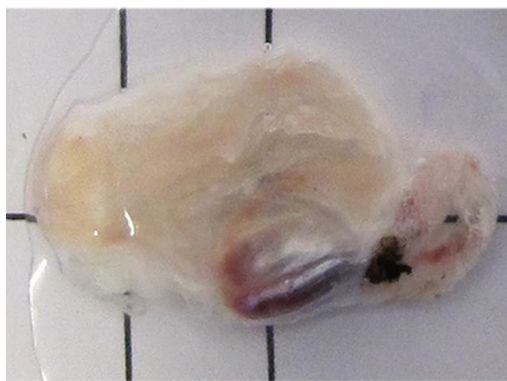




Líneas claramente visibles

*Luz natural*

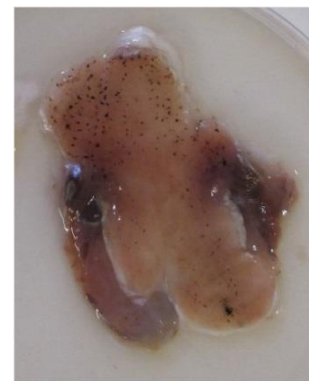
**PUNTUACIÓN 0**



Líneas apenas visibles

*Luz transmitida*

**PUNTUACIÓN 1**



Líneas no visibles

*Luz transmitida*

**PUNTUACIÓN 2**

## 2) Presencia de pigmentación y/o exudado

Los trozos de gusanos muertos, los eritrocitos, el tejido de la vejiga natatoria en descomposición y los huevos y las larvas L2 de *A. crassus* deben considerarse exudado.

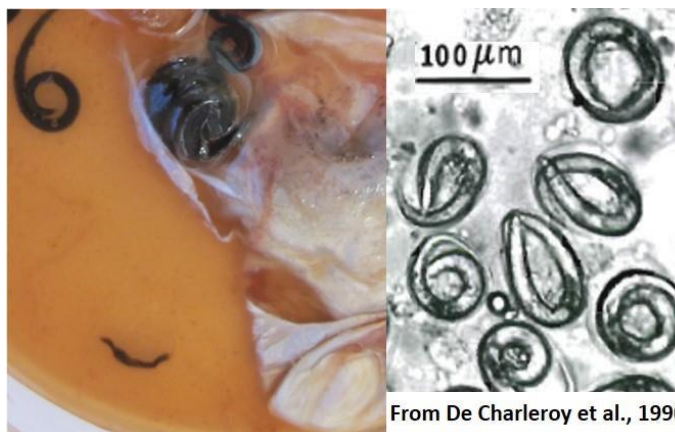
La pigmentación que siga los vasos sanguíneos y/o el canal neumático no se considera pigmentación (como una carretera -----).

- Cuando la vejiga natatoria está congelada, se desprenden trozos pequeños de piel (descamación) en el lumen, pero no son exudado.
- Si no hay ni pigmentación ni exudado: puntuación 0
- Si solo hay pigmentación o solo hay exudado: puntuación 1
- Si hay pigmentación y exudado: puntuación 2



Pigmentación (externa o interna)

**PUNTUACIÓN 1**



Solo exudado (L2 en huevos en la imagen de la derecha)

**PUNTUACIÓN 1**

**PUNTUACIÓN 0**

**PUNTUACIÓN 1**

**PUNTUACIÓN 2**

No hay pigmentación NI hay exudado

Pigmentación O exudado

Pigmentación Y exudado

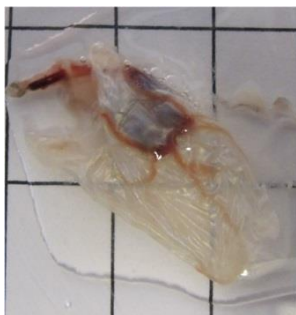
### 3) Grosor de la pared de la vejiga natatoria

Utilizamos un calibre (preferiblemente electrónico).

No se debe aplastar demasiado la pared de la vejiga natatoria. Solo debe apretarse lo suficiente para que no caiga cuando esté en posición vertical

Si la vejiga natatoria tiene un grosor diferente en diferentes lugares, registramos la media.

- Puntuación 0: <1mm
- Puntuación 1:  $\geq 1\text{mm}$  y  $\leq 3\text{mm}$
- Puntuación 2: > 3mm



Menos de 1 mm  
PUNTUACIÓN 0



Entre 1 y 3 mm  
PUNTUACIÓN 1



Más de 3 mm  
PUNTUACIÓN 2

Cuando los análisis no se efectúen en material fresco, la vejiga natatoria debe retirarse y conservarse a -20 °C. Para ello es necesario mantener cada vejiga natatoria en un recipiente pequeño (el tamaño de cada recipiente debe adaptarse al tamaño de la vejiga natatoria) con una codificación adecuada para la identificación de la anguila.

### Referencias

Lefebvre F., P. Contournet y A.J. Crivelli. 2002. *The health state of the eel swimbladder as a measure of parasite pressure by Anguillicola crassus*. Parasitology, 124: 457-463.

## 5. PROTOCOLO DE MUESTREO DE GÓNADAS PARA EVALUAR LA PROPORCIÓN DE SEXOS

Este protocolo está diseñado para la toma de muestras de gónadas de anguilas amarillas para análisis molecular e histológico cuando no sea posible determinar el sexo de los individuos mediante análisis macroscópico. Debería aplicarse en aquellos individuos con una talla entre 20 y 30 cm (algunos peces menores de 30 cm pueden tener gónadas suficientemente desarrolladas para la evaluación macroscópica del sexo y otros mayores de 30 cm en cambio pueden tener gónadas no lo suficientemente desarrolladas).

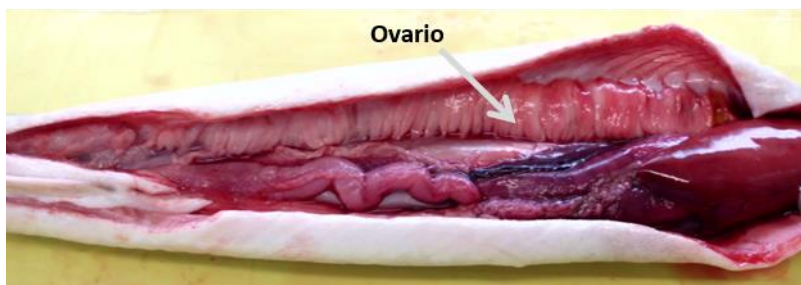
Una vez muertas las anguilas, disecciónelas en cuanto sea posible e inspeccione sus gónadas

### 5.1. Observación macroscópica

Si las anguilas son grandes, especialmente cuando ya son plateadas, es más fácil determinar el sexo:

- Los **ovarios** pueden identificarse por la presencia de pliegues transversales que, cuando la gónada está más desarrollada, la dividen en un gran número de pequeños compartimentos alargados.
- Los **testículos** pueden reconocerse por la presencia de lóbulos individuales en la parte dorsal de la gónada.

HEMBRA



MACHO



Figura 1. Localización y aspecto macroscópico de un ovario y un testículo en la cavidad abdominal de una anguila hembra y un macho.

La distinción morfológica de los testículos y los ovarios es sin embargo difícil en el caso de las anguilas amarillas pequeñas. Es habitual encontrar gónadas indiferenciadas o que se encuentran en etapas intermedias (Beullens *et al.* 1997). Las diferentes categorías (indiferenciado/intersex, macho y hembra) se pueden reconocer siguiendo la Fig.2. Tenga cuidado en no utilizar la separación entre lóbulos (3) como criterio para clasificar a los machos.

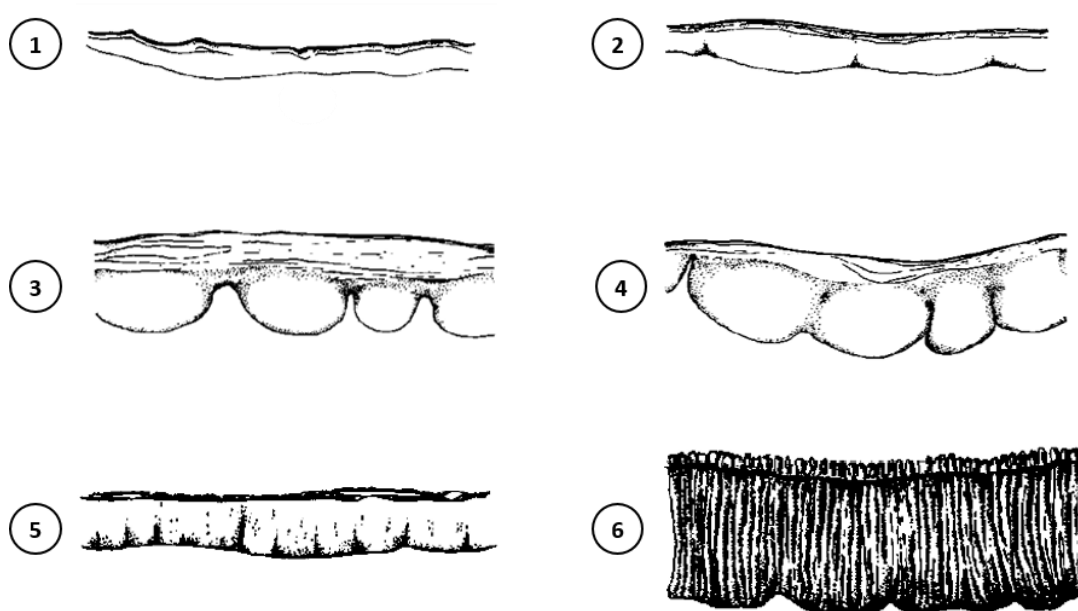


Figura 2. Aspecto morfológico de las gónadas de anguila: Indiferenciado (1 y 2); intersex (3); Macho (4); Hembra (5 y 6) (de Beulens *et al.* 1997).

Si el análisis macroscópico no permite identificar el sexo de las anguilas amarillas, hay que extraer las gónadas para efectuar un análisis adicional (ver Fig. 3 y sección 5.2).



Figura 3. Muestreo de gónadas en una anguila juvenil.



## 5.2. Preparación de la muestra para su análisis molecular e histológico.

Deben adoptarse los siguientes procedimientos:

### A - Análisis molecular

- Puede usar pequeñas gotas de *RNA later* para limitar la degradación del RNA y hacer la gónada más visible *in situ* durante la disección;
- Ponga enseguida una de las gónadas (la primera que extraiga, normalmente la izquierda) en un eppendorf libre de 1,5 ml relleno con líquido *RNA later*;
- Mantenga los eppendorfs a baja temperatura (pero sin congelar) e incúbelos por lo menos 1 hora (puede ser por la noche) a 4°C;
- Retire el *RNA later* y perfore la tapa (agujero pequeño) antes de almacenarlo a -80 °C.

### B- Análisis histológico

- Coloque la gónada derecha en un casete de inclusión Histosette de micromesh;
- Sumérjala en Bouin durante entre 1 y 3 horas;
- Enjuáguela durante 1 hora con agua limpia;
- Transfiérala a formol al 10%.

## Referencias

Beullens K., E.H. Eding, P. Gilson, F. Ollevier, J. Komen y C.J.J. Richter. 1997. *Gonadal differentiation, intersexuality and sex ratios of European eel (Anguilla anguilla L.) maintained in captivity*. Aquaculture, 153:135-150.



# PLANTILLAS

## para registrar datos de campo y laboratório

**Interreg**  
**Sudoe**



EUROPEAN UNION









PLANTILLAS para el Protocolo 1  
MUESTREO DE ANGUILA AMARILLA Y ANGUILA PLATEADA EN RÍOS





|                   |      |       |                         |        |
|-------------------|------|-------|-------------------------|--------|
| Nombre del lugar: |      |       | Código del lugar:       |        |
| Coordenadas GPS   | Lat: | Long: | Sistema de coordenadas: | Fecha: |
| Fotos (ref.):     |      |       | Equipo:                 |        |

## Condiciones atmosféricas

|                            |                                    |                                             |                                          |                                              |
|----------------------------|------------------------------------|---------------------------------------------|------------------------------------------|----------------------------------------------|
| Temperatura del aire (°C): |                                    |                                             |                                          |                                              |
| Nubosidad:                 | <input type="checkbox"/> despejado | <input type="checkbox"/> ligeramente nuboso | <input type="checkbox"/> nubosidad media | <input type="checkbox"/> totalmente cubierto |
| Viento:                    | <input type="checkbox"/> ninguno   | <input type="checkbox"/> ligero             | <input type="checkbox"/> moderado        | <input type="checkbox"/> intenso             |
| Lluvia:                    | <input type="checkbox"/> sí        | <input type="checkbox"/> no                 | Antes del muestreo:                      |                                              |

## Tramo de muestreo

|                                                |                                                                           |                                             |                                          |                                             |                                                  |                                   |
|------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------|------------------------------------------|---------------------------------------------|--------------------------------------------------|-----------------------------------|
| Galería fluvial                                | Orilla derecha del río                                                    | <input type="checkbox"/> 0 %                | <input type="checkbox"/> 0%-25%          | <input type="checkbox"/> 25%-50%            | <input type="checkbox"/> 50%-75%                 | <input type="checkbox"/> 75%-100% |
|                                                | Orilla izquierda del río                                                  | <input type="checkbox"/> inexistente        | <input type="checkbox"/> escasa          | <input type="checkbox"/> intermedia         | <input type="checkbox"/> semicontinua            | <input type="checkbox"/> continua |
| Vegetación en el lecho del río                 | Macrófitos / hidrófitos                                                   | <input type="checkbox"/> (0%)               | <input type="checkbox"/> (0%-25%)        | <input type="checkbox"/> (25%-75%)          | <input type="checkbox"/> (75%-100%)              |                                   |
|                                                | Tipo dominante:                                                           | <input type="checkbox"/> plantas superiores | <input type="checkbox"/> musgo           | <input type="checkbox"/> algas filamentosas |                                                  |                                   |
| Residuos leñosos grandes en el lecho del río:  | <input type="checkbox"/> inexistentes                                     | <input type="checkbox"/> escasos            | <input type="checkbox"/> presencia media | <input type="checkbox"/> abundantes         |                                                  |                                   |
|                                                | Tipo de cobertura del lecho del río (seleccione los que estén presentes): |                                             |                                          |                                             |                                                  |                                   |
| <input type="checkbox"/> limos                 |                                                                           | <input type="checkbox"/> arena              | <input type="checkbox"/> grava           | <input type="checkbox"/> piedras            | <input type="checkbox"/> piedras de mayor tamaño | <input type="checkbox"/> losas    |
|                                                |                                                                           | (grano de café - huevo)                     | pequeñas (A5 - A4)                       | mayor tamaño (A4 - A3)                      | (> A3)                                           |                                   |
| Cobertura dentro de la corriente total: _____% |                                                                           |                                             |                                          | Anchura del río (media - m):                |                                                  |                                   |
| Hábitat:                                       | Poza _____%                                                               | Corriente _____%                            | Rápido _____%                            | Profundidad del río (media - m):            |                                                  |                                   |

## Equipo de muestreo

|                                             |                                                       |                                |                                           |                             |                                              |
|---------------------------------------------|-------------------------------------------------------|--------------------------------|-------------------------------------------|-----------------------------|----------------------------------------------|
| Tipo:                                       | <input type="checkbox"/> batería                      | Modelo:                        | <input type="checkbox"/> generador dorsal | Fabricante:                 | <input type="checkbox"/> generador no dorsal |
| Corriente eléctrica:                        | <input type="checkbox"/> pulso (frecuencia: _____ Hz) | <input type="checkbox"/> CC    | <input type="checkbox"/> CCP              | <input type="checkbox"/> CA |                                              |
| Cátodo:                                     | <input type="checkbox"/> anular (diámetro): _____ cm) | <input type="checkbox"/> cable | <input type="checkbox"/> otro (¿cuál?):   |                             |                                              |
| Superficie de pesca neta (m <sup>2</sup> ): | o longitud (cm):                                      |                                | anchura (cm):                             |                             |                                              |

|                                                               |                                                                                                     |                                                                                                                        |
|---------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| (inicio) (fin)<br><b>1ª pasada:</b> ____ H ____ - ____ H ____ | (inicio) (fin)<br><b>2ª pasada:</b> ____ H ____ - ____ H ____<br>media hora después de la 1ª pasada | (inicio) (fin)<br><b>3ª pasada:</b> ____ H ____ - ____ H ____<br>solo si la 2ª pasada captura más ejemplares que la 1ª |
|---------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|

| Parámetros medioambientales      | Parámetros medioambientales      | Parámetros medioambientales      |
|----------------------------------|----------------------------------|----------------------------------|
| Temperatura del agua (°C):       | Temperatura del agua (°C):       | Temperatura del agua (°C):       |
| Temperatura del agua (mg/L o %): | Temperatura del agua (mg/L o %): | Temperatura del agua (mg/L o %): |
| TDS (mg/L):                      | TDS (mg/L):                      | TDS (mg/L):                      |
| Conductividad (µS/cm):           | Conductividad (µS/cm):           | Conductividad (µS/cm):           |
| Velocidad de la corriente (m/s)  | Velocidad de la corriente (m/s)  | Velocidad de la corriente (m/s)  |

| Parámetros de muestreo                    | Parámetros de muestreo | Parámetros de muestreo |
|-------------------------------------------|------------------------|------------------------|
| Superficie de muestreo (m <sup>2</sup> ): |                        |                        |
| Tiempo de pesca (min):                    | Tiempo de pesca (min): | Tiempo de pesca (min): |
| Tensión (V):                              | Tensión (V):           | Tensión (V):           |
| Amperaje (A):                             | Amperaje (A):          | Amperaje (A):          |

## Observaciones

|  |
|--|
|  |
|--|

Código del lugar:

Fecha:

| Nº de ejemplares en cada pasada  |    |    |    | Nº de ejemplares en cada pasada        |    |    |    | Nº de ejemplares en cada pasada      |    |    |    |
|----------------------------------|----|----|----|----------------------------------------|----|----|----|--------------------------------------|----|----|----|
| Especies                         | 1ª | 2ª | 3ª | Especies                               | 1ª | 2ª | 3ª | Especies                             | 1ª | 2ª | 3ª |
| <i>Acipenser baerii</i>          |    |    |    | <i>Dicentrarchus labrax</i>            |    |    |    | <i>Petromyzon marinus</i>            |    |    |    |
| <i>Abramis brama</i>             |    |    |    | <i>Esox lucius</i>                     |    |    |    | <i>Phoxinus phoxinus</i>             |    |    |    |
| <i>Abramis brama</i>             |    |    |    | <i>Fundulus heteroclitus</i>           |    |    |    | <i>Phoxinus phoxinus</i>             |    |    |    |
| <i>Achondrostoma arcasii</i>     |    |    |    | <i>Gambusia affinis</i>                |    |    |    | <i>Phoxinus septimaniae</i>          |    |    |    |
| <i>Achondrostoma occidentale</i> |    |    |    | <i>Gambusia holbrooki</i>              |    |    |    | <i>Pimephales promelas</i>           |    |    |    |
| <i>Achondrostoma oligolepis</i>  |    |    |    | <i>Gasterosteus aculeatus</i>          |    |    |    | <i>Platichthys flesus</i>            |    |    |    |
| <i>Achondrostoma salmantinum</i> |    |    |    | <i>Gobio alverniae</i>                 |    |    |    | <i>Poecilia reticulata</i>           |    |    |    |
| <i>Acipenser sturio</i>          |    |    |    | <i>Gobio gobio</i>                     |    |    |    | <i>Pseudochondrostoma duriense</i>   |    |    |    |
| <i>Alburnoides bipunctatus</i>   |    |    |    | <i>Gobio lozanoi</i>                   |    |    |    | <i>Pseudochondrostoma polylepis</i>  |    |    |    |
| <i>Alburnus alburnus</i>         |    |    |    | <i>Gobio occitaniae</i>                |    |    |    | <i>Pseudochondrostoma willkommii</i> |    |    |    |
| <i>Alburnus alburnus</i>         |    |    |    | <i>Gobius paganellus</i>               |    |    |    | <i>Pseudorasbora parva</i>           |    |    |    |
| <i>Alosa alosa</i>               |    |    |    | <i>Gymnocephalus cernua</i>            |    |    |    | <i>Pungitius laevis</i>              |    |    |    |
| <i>Alosa fallax</i>              |    |    |    | <i>Hucho hucho</i>                     |    |    |    | <i>Pungitius pungitius</i>           |    |    |    |
| <i>Ambloplites rupestris</i>     |    |    |    | <i>Hypophthalmichthys molitrix</i>     |    |    |    | <i>Rhodeus amarus</i>                |    |    |    |
| <i>Ameiurus melas</i>            |    |    |    | <i>Iberochondrostoma lemmingii</i>     |    |    |    | <i>Rutilus rutilus</i>               |    |    |    |
| <i>Ameiurus nebulosus</i>        |    |    |    | <i>Iberochondrostoma lusitanicum</i>   |    |    |    | <i>Salaria fluviatilis</i>           |    |    |    |
| <i>Anaocypris hispanica</i>      |    |    |    | <i>Iberochondrostoma olisiponensis</i> |    |    |    | <i>Salmo cettii</i>                  |    |    |    |
| <i>Aphanius baeticus</i>         |    |    |    | <i>Iberochondrostoma oretanum</i>      |    |    |    | <i>Salmo rhodanensis</i>             |    |    |    |
| <i>Aphanius fasciatus</i>        |    |    |    | <i>Iberocypris palaciosi</i>           |    |    |    | <i>Salmo salar</i>                   |    |    |    |
| <i>Aphanius iberus</i>           |    |    |    | <i>Ictalurus punctatus</i>             |    |    |    | <i>Salmo trutta</i>                  |    |    |    |
| <i>Atherina boyeri</i>           |    |    |    | <i>Lampetra alavariensis</i>           |    |    |    | <i>Salvelinus alpinus</i>            |    |    |    |
| <i>Australoheros facetus</i>     |    |    |    | <i>Lampetra auremensis</i>             |    |    |    | <i>Salvelinus fontinalis</i>         |    |    |    |
| <i>Barbatula barbatula</i>       |    |    |    | <i>Lampetra fluviatilis</i>            |    |    |    | <i>Salvelinus umbla</i>              |    |    |    |
| <i>Barbatula quignardi</i>       |    |    |    | <i>Lampetra lusitanica</i>             |    |    |    | <i>Sander lucioperca</i>             |    |    |    |
| <i>Barbus barbus</i>             |    |    |    | <i>Lampetra planeri</i>                |    |    |    | <i>Scardinius erythrophthalmus</i>   |    |    |    |
| <i>Barbus haasi</i>              |    |    |    | <i>Lepomis gibbosus</i>                |    |    |    | <i>Silurus glanis</i>                |    |    |    |
| <i>Barbus meridionalis</i>       |    |    |    | <i>Leucaspis delineatus</i>            |    |    |    | <i>Squalius alburnoides</i>          |    |    |    |
| <i>Blicca bjoerkna</i>           |    |    |    | <i>Leuciscus aspius</i>                |    |    |    | <i>Squalius aradensis</i>            |    |    |    |
| <i>Carassius auratus</i>         |    |    |    | <i>Leuciscus bearnensis</i>            |    |    |    | <i>Squalius carolitertii</i>         |    |    |    |
| <i>Carassius carassius</i>       |    |    |    | <i>Leuciscus burdigalensis</i>         |    |    |    | <i>Squalius castellanus</i>          |    |    |    |
| <i>Carassius gibelio</i>         |    |    |    | <i>Leuciscus leuciscus</i>             |    |    |    | <i>Squalius cephalus</i>             |    |    |    |
| <i>Chelon auratus</i>            |    |    |    | <i>Leuciscus oxyrrhis</i>              |    |    |    | <i>Squalius laietanus</i>            |    |    |    |
| <i>Chelon labrosus</i>           |    |    |    | <i>Lota lota</i>                       |    |    |    | <i>Squalius malacitanus</i>          |    |    |    |
| <i>Chelon ramada</i>             |    |    |    | <i>Luciobarbus bocagei</i>             |    |    |    | <i>Squalius pyrenaicus</i>           |    |    |    |
| <i>Chelon saliens</i>            |    |    |    | <i>Luciobarbus comizo</i>              |    |    |    | <i>Squalius torgalensis</i>          |    |    |    |
| <i>Chondrostoma nasus</i>        |    |    |    | <i>Luciobarbus graellsii</i>           |    |    |    | <i>Squalius valentinus</i>           |    |    |    |
| <i>Cobitis bilineata</i>         |    |    |    | <i>Luciobarbus guiraonis</i>           |    |    |    | <i>Syngnathus abaster</i>            |    |    |    |
| <i>Cobitis calderoni</i>         |    |    |    | <i>Luciobarbus microcephalus</i>       |    |    |    | <i>Telestes souffia</i>              |    |    |    |
| <i>Cobitis paludica</i>          |    |    |    | <i>Luciobarbus sclateri</i>            |    |    |    | <i>Thymallus thymallus</i>           |    |    |    |
| <i>Cobitis taenia</i>            |    |    |    | <i>Luciobarbus steindachneri</i>       |    |    |    | <i>Tinca tinca</i>                   |    |    |    |
| <i>Cobitis vettonica</i>         |    |    |    | <i>Micropterus salmoides</i>           |    |    |    | <i>Triplophysa coniptera</i>         |    |    |    |
| <i>Coregonus lavaretus</i>       |    |    |    | <i>Misgurnus fossilis</i>              |    |    |    | <i>Umbra pygmaea</i>                 |    |    |    |
| <i>Cottus aturi</i>              |    |    |    | <i>Mugil cephalus</i>                  |    |    |    | <i>Valencia hispanica</i>            |    |    |    |
| <i>Cottus duranii</i>            |    |    |    | <i>Oncorhynchus kisutch</i>            |    |    |    | <i>Vimba vimba</i>                   |    |    |    |
| <i>Cottus gobio</i>              |    |    |    | <i>Oncorhynchus mykiss</i>             |    |    |    | <i>Zingel asper</i>                  |    |    |    |
| <i>Cottus hispaniolensis</i>     |    |    |    | <i>Osmerus eperlanus</i>               |    |    |    |                                      |    |    |    |
| <i>Cottus perifretum</i>         |    |    |    | <i>Pachychilon pictum</i>              |    |    |    |                                      |    |    |    |
| <i>Cottus petiti</i>             |    |    |    | <i>Parachondrostoma arrigonis</i>      |    |    |    |                                      |    |    |    |
| <i>Cottus rondeleti</i>          |    |    |    | <i>Parachondrostoma miegii</i>         |    |    |    |                                      |    |    |    |
| <i>Cottus sabaudicus</i>         |    |    |    | <i>Parachondrostoma toxostoma</i>      |    |    |    |                                      |    |    |    |
| <i>Ctenopharyngodon idella</i>   |    |    |    | <i>Parachondrostoma turiensis</i>      |    |    |    |                                      |    |    |    |
| <i>Cyprinus carpio</i>           |    |    |    | <i>Perca fluviatilis</i>               |    |    |    |                                      |    |    |    |

(Longitud Total - mm; Peso Total - g (0,01g); **Inspección visual:** presencia de una Línea Lateral Visible – sí/no; Color del Cuerpo y Contraste entre las partes dorsal y ventral- sí/no; **Si anguila plateada y/o anguilas > 300/350 mm:** Diámetro Vertical del Ojo, Diámetro Horizontal del Ojo, Longitud de la Aleta Pectoral – mm, Fase Plateada – Durif et al., 2009; **Observaciones:** Liberada - L; Retenida para más Análisis - A.)





PLANTILLAS para el Protocolo 2  
ESTIMACIÓN DEL RECLUTAMIENTO DE LA ANGULA







|                   |                         |       |                                         |
|-------------------|-------------------------|-------|-----------------------------------------|
| Nombre del lugar: |                         |       | Código del lugar:                       |
| Coordenadas GPS   | Lat:                    | Long: | Sistema de coordenadas:                 |
| Fecha:            | Fecha de la Luna Nueva: |       | Horas: (inicio - fin) ___H___ - ___H___ |
| Fotos (ref.):     |                         |       | Equipo:                                 |

### Condiciones atmosféricas

|                            |                                    |                                              |                                                                                            |
|----------------------------|------------------------------------|----------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------|
| Temperatura del aire (°C): |                                    |                                              |                                                                                            |
| Nubosidad:                 | <input type="checkbox"/> despejado | <input type="checkbox"/> parcialmente nuboso | <input type="checkbox"/> moderadamente nuboso <input type="checkbox"/> totalmente cubierto |
| Viento:                    | <input type="checkbox"/> ninguno   | <input type="checkbox"/> ligero              | <input type="checkbox"/> moderado <input type="checkbox"/> intenso                         |
| Lluvia:                    | <input type="checkbox"/> sí        | <input type="checkbox"/> no                  | Antes del muestreo:                                                                        |

### Sección de muestreo

|                                                 |                           |                              |
|-------------------------------------------------|---------------------------|------------------------------|
| Tiempo de pesca total (minutos):                | Hora de la marea: ___H___ | Altura de la marea (m):      |
| Superficie de apertura de la red de pesca (m²): |                           | Anchura del río (media - m): |

### Condiciones medioambientales **EN CASO DE PESCA CONTINUA** (en caso contrario, rellenar la página siguiente)

|                            | Inicio  | Fin     |                        | Inicio | Fin |
|----------------------------|---------|---------|------------------------|--------|-----|
| Hora:                      | ___H___ | ___H___ | Conductividad (µS/cm): |        |     |
| Temperatura del agua (°C): |         |         | TDS (mg/L):            |        |     |
| Salinidad:                 |         |         | Profundidad (m):       |        |     |
| Flujómetro:                |         |         |                        |        |     |

### Observaciones (describa el método de pesca, incluyendo el tipo de nasa/red de pesca)

## 2. Reclutamiento de la angula

Código del lugar:

Fecha:

Datos de muestreo **SI NO SE TRATA DE PESCA CONTINUA**

(*Réplicas - 20 minutos cada una; Temperatura del Agua - °C; Salinidad; Conductividad -  $\mu$ S/cm; TDS - mg/L; Profundidad – m; *Peso Total pescado - 0,01g; Sub-muestra - 0,01g**)

| Répl.<br>Nº | Horas  |  | Flujómetro | Parámetros medioambientales |           |                    |            |                 | PT (g) | Sub-muestra (g) | Observaciones |
|-------------|--------|--|------------|-----------------------------|-----------|--------------------|------------|-----------------|--------|-----------------|---------------|
|             |        |  |            | TA (°C)                     | Salinidad | Cond ( $\mu$ S/cm) | TDS (mg/L) | Profundidad (m) |        |                 |               |
|             | Inicio |  |            |                             |           |                    |            |                 |        |                 |               |
|             | Fin    |  |            |                             |           |                    |            |                 |        |                 |               |
|             | Inicio |  |            |                             |           |                    |            |                 |        |                 |               |
|             | Fin    |  |            |                             |           |                    |            |                 |        |                 |               |
|             | Inicio |  |            |                             |           |                    |            |                 |        |                 |               |
|             | Fin    |  |            |                             |           |                    |            |                 |        |                 |               |
|             | Inicio |  |            |                             |           |                    |            |                 |        |                 |               |
|             | Fin    |  |            |                             |           |                    |            |                 |        |                 |               |
|             | Inicio |  |            |                             |           |                    |            |                 |        |                 |               |
|             | Fin    |  |            |                             |           |                    |            |                 |        |                 |               |
|             | Inicio |  |            |                             |           |                    |            |                 |        |                 |               |
|             | Fin    |  |            |                             |           |                    |            |                 |        |                 |               |
|             | Inicio |  |            |                             |           |                    |            |                 |        |                 |               |
|             | Fin    |  |            |                             |           |                    |            |                 |        |                 |               |
|             | Inicio |  |            |                             |           |                    |            |                 |        |                 |               |
|             | Fin    |  |            |                             |           |                    |            |                 |        |                 |               |
|             | Inicio |  |            |                             |           |                    |            |                 |        |                 |               |
|             | Fin    |  |            |                             |           |                    |            |                 |        |                 |               |
|             | Inicio |  |            |                             |           |                    |            |                 |        |                 |               |
|             | Fin    |  |            |                             |           |                    |            |                 |        |                 |               |
|             | Inicio |  |            |                             |           |                    |            |                 |        |                 |               |
|             | Fin    |  |            |                             |           |                    |            |                 |        |                 |               |
|             | Inicio |  |            |                             |           |                    |            |                 |        |                 |               |
|             | Fin    |  |            |                             |           |                    |            |                 |        |                 |               |

## Datos biométricos

(Longitud Total - mm; Peso Total - 0,01 g; Fase de pigmentación - consulte el protocolo)

[illegible]





PLANTILLA para el Protocolo 3  
PREPARACIÓN DE OTOLITOS Y LECTURA DE LA EDAD





[illegible]







PLANTILLA para el Protocolo 4  
EVALUACIÓN DE LA INFECCIÓN POR *ANGUILICOLA CRASSUS* Y EL  
ÍNDICE DEGENERATIVO DE LA VEJIGA NATATORIA (SDI)





[illegible]





PLANTILLA para el Protocolo 5  
MUESTREO DE GÓNADAS PARA EVALUAR LA PROPORCIÓN DE  
SEXOS





(**Longitud Total** - mm; **Peso Total** - g; **Peso Eviscerado** - g)

[illegible]

