

## 1. PROTOCOLO DE AMOSTRAGEM DE ENGUIAS AMARELAS E PRATEADAS EM RIOS

O seguinte protocolo descreve as diretrizes necessárias à realização de amostragens para estimar a densidade de enguias amarelas e prateadas em cada bacia-piloto, recorrendo a pesca elétrica. Além de apresentar os critérios para determinar os locais de amostragem e os procedimentos para realizar a captura de peixes, este protocolo define os métodos a utilizar para a recolha de dados biométricos de enguias, de dados sobre outras espécies de peixes e de dados de variáveis ambientais.

As enguias amarelas e prateadas devem ser transportadas para o laboratório de modo a implementar outros protocolos. O Protocolo para preparação de otólitos e determinação da idade, deve ser implementado para cumprir um dos objetivos do SUDOANG (**obrigatório**), enquanto que o Protocolo para Avaliação da Infeção por Anquillilicola crassus e o Índice Degenerativo da Bexiga Natatória (SDI) e o Protocolo de Amostragem de Gónadas para Avaliação do Rácio Sexual, são **facultativos**.

### 1.1. Época de amostragem

A amostragem para calcular a densidade de enguias amarelas e prateadas deve ser realizada no **final do verão /início do outono**, de modo a garantir a captura de enguias prateadas. Assim, prevê-se que, dependendo da localização (latitude) da bacia hidrográfica, as amostragens sejam realizadas quando as enguias se encontrem já no estado de enguia prateada, **MAS** antes da sua fuga, que normalmente ocorre no outono/inverno.

### 1.2. Seleção dos locais de amostragem

A pesca elétrica será realizada em cada bacia-piloto, apenas em água doce, quer no curso principal do rio quer nos seus afluentes (até afluentes de ordem 3). O **troço a amostrar deve ser representativo do segmento do rio**, cobrindo a diversidade física existente e contendo pelo menos um rápido, caso exista um no segmento. Para uma melhor compreensão, apresentamos uma representação esquemática, assim como as definições dos termos que são usados.

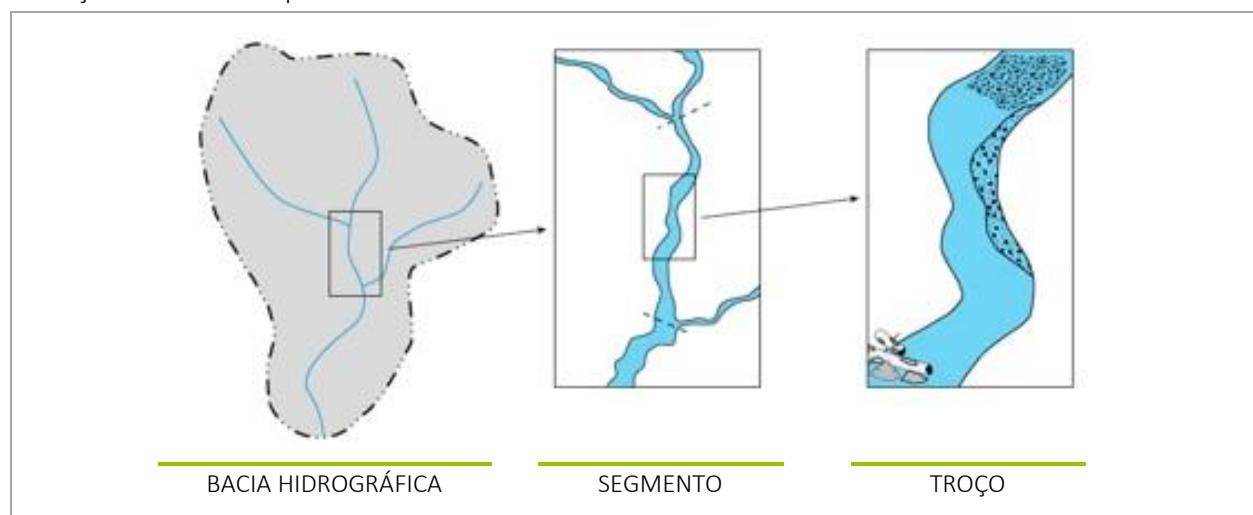


Figura 1. Representação esquemática dos termos usados no protocolo.

**BACIA HIDROGRÁFICA:** Superfície de escoamento de um rio e seus afluentes.

**SEGMENTO:** secção de um curso de água, dentro da bacia hidrográfica, cujas características bióticas e propriedades físicas são semelhantes (*e.g.* declive e caudal semelhantes).

**TROÇO:** Uma secção de um curso de água dentro do segmento, de onde devem recolher-se os dados biológicos.

Os troços a amostrar devem ser **fotografados** e **georreferenciados** com recurso a GPS, de modo a poderem ser reconhecidos.

Apresenta-se de seguida, um critério que pode ser usado para **definir o número e a localização** dos locais de amostragem que são representativos do segmento do rio. Para tal, devem seguir-se os passos seguintes:

### 1. Dividir a bacia hidrográfica em segmentos hidrológicos

- Para determinar os segmentos, serão usadas mudanças de declive, de caudal (confluências dos afluentes) e/ou perturbações (reservatórios);
- No caso do tipo de declive se repetir, deve selecionar-se o segmento mais comprido ou o que melhor representa o declive do curso de água a jusante;
- Se o declive do curso de água for suave, então devem usar-se alterações no caudal (confluências dos afluentes) para designar os segmentos;
- Quando o declive é suave e não existem afluentes, os segmentos devem ser posicionados a iguais distâncias entre si;
- Os segmentos não devem ser colocados em reservatórios.

### 2. Medir cada segmento hidrológico

- Os segmentos com >10 km de comprimento podem ser divididos, de acordo com a inclinação, em mínimo, médio e máximo.
  - A inclinação indica o declive do curso de água, que por sua vez, influencia o transporte dos sedimentos e as características de caudal.
  - A inclinação é definida como a diferença entre a elevação a montante ( $Elv_{Mont}$ ) e a elevação a jusante ( $Elv_{Jus}$ ), dividida pelo comprimento desse segmento ( $Comp_{Seg}$ ):

$$\frac{(Elv_{Mont} - Elv_{Jus})}{Comp_{Seg}}$$

### 3. Posicionar os troços de amostragem dentro de um segmento

- Um troço deve ser posicionado no centro de um segmento com idêntico declive e caudal e ser representativo desse segmento.

- Se o **comprimento do segmento for inferior a 60 km**, o número de troços a amostrar deve ser o indicado na tabela seguinte:

Comprimento	Número de troços
30-60 km	3
11-29 km (< 30)	2
1-9 km (< 10)	0 - 1

- Se o **comprimento do segmento for igual ou superior a 60 km** colocar um troço a cada 20 km, conforme indicado na tabela seguinte:

Comprimento	Número de troços
60 km	3
80 km	4
100 km	5

### 1.3. Comprimento do troço de amostragem

A escala espacial é um aspeto crítico em qualquer protocolo de amostragem. Independentemente do local onde a amostragem é realizada, a grande maioria das espécies que possam estar presentes na área de ação do campo elétrico, devem ser capturadas dentro deste troço do curso de água. Para padronizar o protocolo de pesca deve-se definir o comprimento do troço onde são recolhidas as amostras. Os seguintes comprimentos devem ser adotados:

Tipo de curso de água	Comprimento do troço	Mínimo	Máximo
Curso de água vadeável	20 vezes o comprimento do leito molhado	100 m	300 m
Curso de água não vadeável	10 vezes o comprimento do leito molhado	300 m	500 m

### 1.4. Métodos de amostragem

A amostragem de peixes será realizada com recurso a pesca elétrica. A condutividade do local determinará a voltagem inicial a selecionar. Recomenda-se a seleção das seguintes voltagens como valores máximos, em função da condutividade da água: **400 V** para **condutividade elevada** ( $> 300 \mu\text{S}/\text{cm}$ ); **800 V** para **condutividade média** ( $100 - 300 \mu\text{S}/\text{cm}$ ); **1000 V** para **condutividade baixa** ( $< 100 \mu\text{S}/\text{cm}$ ).

- É desejável que a equipa seja composta por pelo menos quatro (4) pessoas. Um (1) operador deverá transportar o ânodo e três (3) elementos deverão transportar camaroeiros auxiliares para captura dos peixes que estejam atordoados ou a tentar fugir, e colocá-los dentro do balde. Os peixes devem ser removidos, quanto antes, do campo elétrico.

- É recomendável usar **Corrente Contínua** (DC) porque é menos prejudicial para os peixes, mortalidade e lesões nos peixes devem ser reduzidas ao mínimo (a voltagem e a intensidade devem ser registadas).
- Durante o processo de **amostragem**, esta deve ser realizada deixando o **ânodo 30 s** dentro de água e soltando o botão, logo de seguida, **OU**, em áreas de grande densidade, deixar o ânodo na água até os peixes serem atraídos. Em qualquer dos casos, deve fazer-se sempre um movimento circular com o ânodo (~1m diâmetro). O tamanho da malhagem da rede do ânodo deve ser suficientemente pequena (1-2 mm x 1-2 mm), de modo a reter as enguias de todas as dimensões.
- Por cada troço de amostragem, devem efetuar-se **pelo menos 2 passagens** com um intervalo de **30 min entre cada passagem**. SE na **2ª passagem** são capturados mais indivíduos do que na **1ª**, deve efetuar-se **uma 3ª passagem**, novamente com um intervalo de 30 min. A quantidade de enguias capturadas, em cada passagem, deve ser registada separadamente.
- **Após cada passagem**, toda a amostra de enguias deve ser **medida e pesada**, tão rápido quanto possível. As capturas acessórias (*Bycatch*) devem ser identificadas e o número de indivíduos registado. Todos os exemplares capturados nas sucessivas passagens devem ser mantidos num recipiente colocado no rio (equipado com uma tampa e pequenas aberturas que permitam a renovação da água, mas impeçam a fuga dos peixes mais pequenos) até que se termine a amostragem e, só devem ser devolvidos à água no final de realizado todo o registo biométrico.
- Independentemente da profundidade do troço (ver abaixo) a pesca deve ser **SEMPRE realizada** de jusante para montante. No entanto, os procedimentos deverão ser diferentes de acordo com a profundidade do rio:

#### **Em rios de baixa profundidade (< 0,8 m profundidade)**

- Em **rios estreitos** (largura < 15 m), a pesca deve ser efetuada ao longo da largura do rio, incluindo ambas as margens e o centro do rio. No entanto, em **rios largos** (largura ≥ 15 m), o operador deve caminhar lentamente para montante, ao longo do curso de água, descrevendo um **zig-zag** entre as duas margens, de modo a cobrir todos os habitats existentes e remover os peixes que aí estão abrigados.

#### **Em rios profundos (≥ 0,8 m profundidade)**

- A pesca elétrica deve ser realizada APENAS nas margens do rio, uma vez que a eficácia da mesma se torna bastante reduzida quando efetuada em águas profundas, especialmente no caso de a espécie alvo ser bêntica, como acontece com a enguia.
- A pesca elétrica realizada vadeando o rio, é limitada pela profundidade a partir da qual deixa de ser seguro percorrer o rio a pé. Não é aconselhável colocar o ânodo a uma profundidade em que este deixe de ser visível.

## 1.5. Dados ambientais a recolher no campo

Durante a amostragem, devem ser medidos e registados os seguintes parâmetros, **sempre que surjam mudanças no habitat:**

- Profundidade (m);
- Velocidade da corrente (m/s);
- Temperatura da água (°C);
- Condutividade ( $\mu\text{S}/\text{cm}$ );
- Oxigénio dissolvido (mg/L OU %);
- Tipo de **substrato** e de **vegetação nas margens** e **cobertura do leito do rio** devem ser registados (formatos e classes indicados na base de dados, no final do protocolo);
- A **área** de amostragem ( $\text{m}^2$ ), e o **tempo de amostragem** (min) devem ser igualmente registados.

## 1.6. Dados biológicos a recolher no campo, por cada passagem

Os dados seguintes devem ser registados no campo, para cada enguia:

- Comprimento total (mm);
- Peso total (0,01 g);
- Identificação da fase da enguia (amarela ou prateada) através de:

### 1. Inspeção visual:

- presença de uma linha lateral conspícuas;
- cor do corpo e contraste entre a parte dorsal e a parte ventral.



### 2. Para todas as enguias com comprimento maior do que 300/350 mm, deve medir:

- Comprimento da barbatana peitoral;
- Diâmetros vertical e horizontal do olho (sempre do olho esquerdo, salvo se estiver deformado ou ausente. Nesse caso, isso deve ser anotado no campo das observações);

O limite de 300/350 mm deve ser ajustado de acordo com a latitude. Este limite corresponde ao tamanho mínimo de prateação de enguias na região sul da área de distribuição.

- Para confirmar o estado da enguia prateada, deve-se usar a classificação de Durif *et al.* (2009). O código, em linguagem de programação R (*Rscript*), a utilizar para calcular/identificar em que estado de desenvolvimento se encontra a enguia prateada, encontra-se no final do protocolo.



- As capturas acessórias devem igualmente ser identificadas e contadas (Espécies de peixes e *Procambarus clarkii*) em cada passagem.

## 1.7. Amostras para análise em laboratório

### Protocolo obrigatório

Para cumprir os objetivos do projeto SUDOANG, devem ser capturadas **20 enguias prateadas e 60 enguias amarelas /bacia piloto /ano** e posteriormente analisadas em laboratório para determinar a idade (*Protocolo para preparação de Otólitos e determinação da idade*). A amostra de enguias amarelas deve ser **estratificada** para abranger todos os tamanhos e, portanto, aumentar a diversidade das idades. As enguias amarelas devem ser capturadas nos troços inferior, intermédio e superior da bacia hidrográfica (20 enguias em cada área=60 enguias) de modo a serem representativas dos tamanhos existentes em cada área.

### Protocolos facultativos

CASO sejam implementados outros protocolos [*Protocolo para Avaliar a Infeção por Anguillicola crassus e o Índice Degenerativo da Bexiga Natatória (SDI)*] assim como o *Protocolo de Amostragem de Gónadas para Avaliação do Rácio Sexual*, as enguias devem ser analisadas o mais rapidamente possível (preferivelmente frescas).

Por forma a reduzir o sacrifício animal, as enguias capturadas para determinação da idade devem ser as mesmas usadas para análise da infecção por *Anguillicola crassus*, enquanto que somente as enguias que não tenham uma aparência típica de macho ou fêmea, devem ser usadas para avaliação da proporção dos sexos (análise molecular e histológica).

A identificação de cada enguia trazida para o laboratório e o local de amostragem devem ser registados e mantidos constantes para todas as análises.

## 1.8. Equipamento de campo

- Aparelho de pesca elétrica (até 1000 V);
- Ânodo e cátodo
- Luvas de borracha;
- Botas altas de borracha (*Waders*);
- Camaroeiros auxiliares (3x)

- Recipientes (*e. g.* baldes) para colocar o peixe capturado;
- Réguas e escala (Ictiómetro);
- Balança de precisão;
- Sonda multiparamétrica;
- Correntómetro;
- GPS e máquina fotográfica;
- Craveira digital.

### 1.9. Rscript para identificar o estado de desenvolvimento das enguias prateadas baseado em Durif *et al.* (2009)

O projeto [stacomI](#) é um pacote de acesso livre (base de dados Postgres, JAVA R) para tratamento da informação de monitorização da migração. Um dos métodos de classe desenvolvido neste pacote permite calcular o estado de desenvolvimento das enguias prateadas, de Durif.

Esta classe contém uma base de dados com coeficiente Durif, e como tal poderá usar alguma das funções internas do pacote para calcular o estádio. Para usar a função `fun_stage_durif` deverá criar uma base de dados com colunas

*Comprimento do corpo BL (mm);*

*Peso W (g)*

*Diâmetro vertical do olho Dv (mm)*

*Diâmetro horizontal do olho Dh (mm)*

*Comprimento da barbatana peitoral FL (mm)*

```
requer(stacomI)

# Carregar os coeficientes contidos em Durif
dados("coef_durif")

#####
# Para usar a função fun_stage_durif manualmente
# criar uma matriz com as colunas BL", "W", "Dv", "Dh", "FL"
#####
# aqui extraídas a partir dos dados disponíveis
silver_eel<-as.matrix(r_silver@calcdatal[1][,c("BL","W","Dv","Dh","FL")])
head(silver_eel) # para ver as primeiras linhas
#>      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
stage <- fun_stage_durif(silver_eel) # aplicar a função à matriz
stage[1:10] # Procurar entre os primeiros 10 elementos no vector prateado
#> 25710 25711 25712 25713 25714 25715 25716 25717 25718 25719
#> "FIII" "FIII" "FIII" "FIV" "FIII" "FIII" "FV" "FV" "FIII" "FIII"
```

### Referências

Durif C., Guibert, A., & 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.

Nome do local:				Código do local:	
Coordenadas GPS	Lat:	Long:	Sistema de coordenadas:	Data:	
Fotos (ref):			Equipa:		

**Condições atmosféricas**

Temperatura do ar (°C):					
Nebulosidade:	<input type="checkbox"/> limpo	<input type="checkbox"/> pouco nublado	<input type="checkbox"/> parcialmente nublado	<input type="checkbox"/> muito nublado	
Vento:	<input type="checkbox"/> nulo	<input type="checkbox"/> fraco	<input type="checkbox"/> moderado	<input type="checkbox"/> forte	
Chuva:	<input type="checkbox"/> sim	<input type="checkbox"/> não	Antes da amostragem:		

**Troço de amostragem**

Galeria ribeirinha	Margem direita do rio	0 %	0%-25%	25%-50%	50%-75%	75%-100%
	Margem esquerda do rio	<input type="checkbox"/> ausente	<input type="checkbox"/> esparsa	<input type="checkbox"/> intermédia	<input type="checkbox"/> semi-contínua	<input type="checkbox"/> contínua
vegetação no leito do rio	(%)	(0%)	(0%-25%)	(25%-75%)	(75%-100%)	
	Macrófitos /hidrófitos	<input type="checkbox"/> ausente	<input type="checkbox"/> esparsa	<input type="checkbox"/> intermédia	<input type="checkbox"/> abundante	
	tipo dominante:		<input type="checkbox"/> plantas superiores	<input type="checkbox"/> musgo	<input type="checkbox"/> algas filamentosas	
Detritos lenhosos de grandes dimensões no leito do rio:	(0%)	(0%)	(0%-25%)	(25%-75%)	(75%-100%)	
	<input type="checkbox"/> ausentes	<input type="checkbox"/> esparsos	<input type="checkbox"/> intermédios	<input type="checkbox"/> abundantes		
Tipo de cobertura no leito do rio (escolher os tipos existentes):				Tipo dominante:		
<input type="checkbox"/> vasa	<input type="checkbox"/> areia	<input type="checkbox"/> gravilha (grão de café - ovo)	<input type="checkbox"/> pequenas pedras (A5 - A4)	<input type="checkbox"/> pedras grandes (A5 - A4)	<input type="checkbox"/> blocos/ rochas (> A3)	<input type="checkbox"/> lajes
Cobertura total: _____ %						Largura do rio (média - m):
Habitat: Pool _____ %	Run _____ %	Riffle _____ %	Profundidade do rio (média - m):			
<i>Pool</i> - Habitats sem corrente, geralmente profundos; <i>Run</i> - Águas profundas e rápidas com reduzida turbulência; <i>Riffle</i> - Águas pouco profundas, com correntes rápidas e turbulentas, sobre leito rochoso.						

**Equipamento de amostragem**

Modelo:	Fabricante:	
Tipo: <input type="checkbox"/> bateria	<input type="checkbox"/> gerador dorsal (fixo)	<input type="checkbox"/> gerador não dorsal
Corrente elétrica: <input type="checkbox"/> impulso (frequência: _____ Hz)	<input type="checkbox"/> DC	<input type="checkbox"/> PDC <input type="checkbox"/> AC
Cátodo: <input type="checkbox"/> anel (diâmetro: _____ cm)	<input type="checkbox"/> cabo	<input type="checkbox"/> outros (qual?):
Área rede de pesca (m <sup>2</sup> ):	<i>ou</i> comprimento (cm):	largura (cm):

(Início) <u>  </u> (fim) <u>  </u> <b>1ª passagem:</b> <u>  </u> H <u>  </u> - <u>  </u> H <u>  </u>	(Início) <u>  </u> (fim) <u>  </u> <b>2ª passagem:</b> <u>  </u> H <u>  </u> - <u>  </u> H <u>  </u> meia hora após a 1ª passagem	(Início) <u>  </u> (fim) <u>  </u> <b>3ª passagem:</b> <u>  </u> H <u>  </u> - <u>  </u> H <u>  </u> só se nº enguias 2ª passag. > 1ª passag.
---	---	---

**Parâmetros ambientais**

Temperatura da água (°C):	Temperatura da água (°C):	Temperatura da água (°C):
Oxigénio dissolvido (mg/L ou %);	Oxigénio dissolvido (mg/L ou %);	Oxigénio dissolvido (mg/L ou %);
TDS (mg/L):	TDS (mg/L):	TDS (mg/L):
Condutividade (µS/cm):	Condutividade (µS/cm):	Condutividade (µS/cm):
Velocidade da corrente (m/s)	Velocidade da corrente (m/s)	Velocidade da corrente (m/s)

**Parâmetros de amostragem**

Área amostrada (m <sup>2</sup> ):	Parâmetros de amostragem	Parâmetros de amostragem
Tempo de pesca (min):	Tempo de pesca (min):	Tempo de pesca (min):
Voltagem (V):	Voltagem (V):	Voltagem (V):
Amperagem (A):	Amperagem (A):	Amperagem (A):

**Observações**

--

Código do local:

Data:

N.º Indiv. cada passagem				N.º Indiv. cada passagem				N.º Indiv. cada passagem			
Espécie	1ª	2ª	3ª	Espécie	1ª	2ª	3ª	Espécie	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 bigerri</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 holbrookii</i>				<i>Pimephales promelas</i>			
<i>Achondrostoma oligolepis</i>				<i>Gasterosteus aculeatus</i>				<i>Platichthys flesus</i>			
<i>Achondrostoma salmantinum</i>				<i>Gobio alvernaeae</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>Anaecypris 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 bearbensis</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 slateri</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>Triphlophysa 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>							

Código do local:

**Data:**

## Dados biométricos

(Comprimento Total - mm; Peso Total - g (0.01g); **Inspeção visual:** presença de Linha Lateral Conspicua – sim/não; Cor do Corpo e Contraste entre parte dorsal e ventral – sim/não; **Se for enguia prateada OU se a enguia > 300/350 mm:** Diâmetro Ocular - Vertical, Diâmetro Ocular - Horizontal, Comprimento Barbatana Peitoral – mm, Estado desenvolvimento enguia Prateada – Durif et al., 2009; **Observações:** Libertadas – L; Retidas para futuras Análises – A)

## 1. PROTOCOLE D'ÉCHANTILLONNAGE DE L'ANGUIILLE JAUNE ET ARGENTÉE EN RIVIÈRE

Le protocole ci-après décrit les lignes d'action pour les campagnes d'estimation de la densité des anguilles jaunes et argentées dans chaque bassin pilote par la pêche électrique. Outre la présentation des critères de définition de l'emplacement des sites d'échantillonnage et des campagnes, ce protocole définit également les méthodes de collecte concernant les informations biométriques sur les anguilles, les données sur les autres espèces de poisson et les variables environnementales.

Les anguilles jaunes et argentées doivent être ramenées au laboratoire pour mettre en place d'autres protocoles. Le Protocole d'extraction des otolithes pour la lecture de l'âge doit être mis en place pour atteindre l'un des objectifs de SUDOANG (**obligatoire**), tandis que le Protocole de contrôle de l'infestation par *Anguillicola crassus* et le Niveau de dégénération de la vessie natatoire (NDV), ainsi que le Protocole de contrôle des gonades pour définir le ratio de sexe sont **facultatifs**.

### 1.1. Programmation des campagnes

L'échantillonnage d'estimation de la densité des anguilles jaunes et argentées doit être effectué en **fin d'été/début automne** pour pouvoir capturer des anguilles argentées. Par conséquent, en fonction de l'emplacement (latitude) du bassin, l'échantillonnage doit être réalisé lorsque les anguilles sont déjà au stade argenté **MAIS** avant leur échappement qui a lieu en automne/hiver.

### 1.2. Sélection du site

La pêche électrique sera réalisée dans chaque bassin pilote, uniquement en eau douce, sur le cours d'eau principal et sur ses affluents (jusqu'aux affluents de 3ème ordre). Le **site d'échantillonnage doit être représentatif du segment de rivière** couvrant la diversité physique et contenant au moins un rapide s'il en existe un sur le segment. Nous présentons ci-après une représentation schématique et les définitions des termes utilisés.

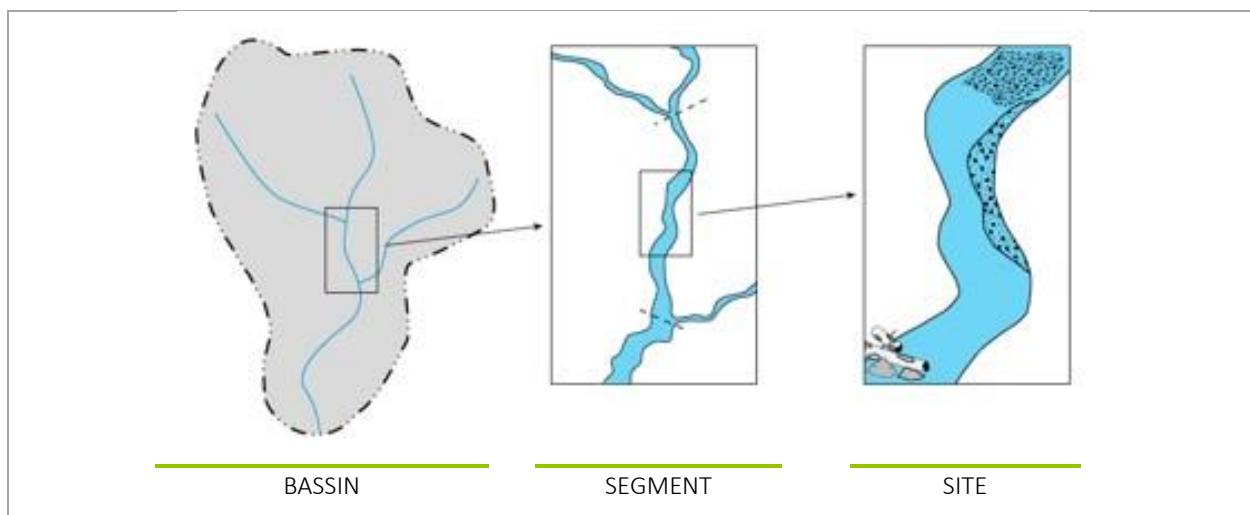


Figure 1. Représentation schématique des termes utilisés dans le protocole.

**BASSIN** : Tout le bassin versant.

**SEGMENT** : section d'un cours d'eau dans le bassin avec des propriétés biotiques et physiques similaires (par ex. pente et débit similaires).

**SITE** : Une partie d'un cours d'eau avec un segment dont les données biologiques seront collectées.

Les sites prélevés doivent être **photographiés** et **géoréférencés** au moyen d'un GPS pour permettre leur reconnaissance.

Un critère possible pour **définir le nombre et l'emplacement** des sites d'échantillonnage représentatifs du segment de rivière est présenté. Le travail doit se dérouler en trois étapes :

### 1. Diviser le bassin de rivière en segments hydrologiques

- Les variations de pente, de débit (confluences, tributaires) et/ou les perturbations (réservoirs) seront utilisées pour définir les segments :
- Si le type de pente se répète, le segment le plus long ou celui qui représente le mieux la pente du cours d'eau en aval sera utilisé.
- Si la pente du cours d'eau est très faible, les écarts de débit (confluence, tributaire) seront utilisés pour désigner les segments ;
- Si la pente est faible et qu'il n'y a pas d'affluents, les segments seront placés à égale distance les uns des autres ;
- Les segments ne doivent pas être placés dans les retenues d'eau.

### 2. Mesurer chaque segment hydrologique

- Les segments >10 km de longueur peuvent être divisés en fonction de la déclivité à ses niveaux minimum, moyen et maximum.
  - La déclivité indique la pente du cours d'eau qui a une influence sur le transport des sédiments et les caractéristiques de décharge.
  - La déclivité est définie comme l'écart entre l'altitude du cours d'eau sur un point en amont ( $Elv_{Upstr}$ ) et l'altitude du cours d'eau sur un point en aval ( $Elv_{Dowstr}$ ) sur un segment de cours d'eau, divisé par la longueur de ce segment ( $Length_{seg}$ ) :

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

### 3. Disposer les sites d'échantillonnage sur un segment

- Un site doit être placé au centre du segment d'une pente ou d'une valeur de débit et doit être représentatif de ce segment.

- Si un **segment a moins de 60 km de longueur**, le nombre de sites doit être le suivant :

Longueur	Nombre de sites
30-60 km	3
11-29 km (< 30)	2
1-9 km (< 10)	0 - 1

- Si la longueur du segment est égale ou supérieure à 60 km, placez un site tous les 20 km comme suit:

Longueur	Nombre de sites
60 km	3
80 km	4
100 km	5

### 1.3. Longueur du site d'échantillonnage

L'échelle spatiale est un aspect critique dans tout protocole d'échantillonnage. Indépendamment de l'endroit où l'échantillonnage a lieu, la grande majorité des espèces susceptibles d'être présentes dans la portée du champ électrique doit être capturée sur la longueur du cours d'eau. Pour standardiser le protocole de pêche, la longueur du site doit être définie. Les longueurs suivantes doivent être adoptées :

Type de cours d'eau	Longueur d'objectif	Minimum	Maximum
Cours d'eau franchissables à gué	20 fois la largeur de la zone mouillée	100 m	300 m
Cours d'eau non franchissables à gué	10 fois la largeur de la zone mouillée	300 m	500 m

### 1.4. Procédures d'échantillonnage

L'échantillonnage des poissons sera réalisé par pêche électrique. La conductivité déterminera la valeur de tension initiale sélectionnée. Il est conseillé de choisir les tensions suivantes comme valeurs maximales, en fonction de la conductivité de l'eau : **400 V** pour **forte conductivité** ( $> 300 \mu\text{S/cm}$ ); **800 V** pour**conductivité moyenne** ( $100 - 300 \mu\text{S/cm}$ ) ; **1000 V** pour **conductivité faible** ( $< 100 \mu\text{S/cm}$ ).

- Par une équipe composée d'au moins quatre (4) personnes. Un (1) opérateur s'occupant du transport de l'anode et trois (3) autres portant les épuisettes auxiliaires pour capturer les poissons étourdis ou fuyant et les déposer dans un seau. Les poissons doivent être écartés le plus tôt possible du champ électrique.

- L'utilisation du **courant continu** est recommandée pour sa moindre nocivité et ses mortalités réduites pour les poissons et les blessures infligées aux poissons qui doivent être aussi limitées que possible (la tension et l'intensité doivent être notées).
- Lors du **balayage**, prélevez l'échantillon en plaçant l'**anode dans l'eau pendant 30s** puis relâchez le bouton **OU**, dans les zones de grande densité, laissez l'anode jusqu'à ce que les poissons soient attirés ; L'anode doit être déplacée en cercle (~1m de diamètre). La maille du filet de l'épuisette doit être aussi petite que possible pour empêcher la fuite des petites anguilles (1-2 mm).
- Au moins **2 passages** doivent être faits par site d'échantillonnage, avec **30 minutes d'intervalle entre l'un et l'autre**. Si le **2ème passage permet de collecter plus d'individus** que le 1er, un **3ème passage doit être effectué**, à nouveau 30 minutes plus tard. La quantité d'anguilles prises à chaque passage doit être enregistrée séparément.
- A **chaque passage**, toutes les anguilles échantillonnées doivent être **mesurées** et **pesées** dès que possible. Les captures correspondantes doivent être identifiées et le nombre d'individus enregistrés. Tous les poissons capturés doivent être placés en viviers équipés de couvercles et avec des ouvertures suffisamment réduites pour empêcher la fuite des petits poissons. Tant que l'équipe de pêche est au travail, les poissons ne doivent pas être relâchés. Ils doivent retourner en vivier après traitement biométrique si la pêche n'est pas terminée.
- Indépendamment de la profondeur du site d'échantillonnage (voir ci-après), la capture **DOIT TOUJOURS se faire de l'aval vers l'amont**. La pêche peut néanmoins être réalisée de manière différente en fonction de la profondeur de la rivière :

#### Dans les rivières peu profondes (< 0,8 m de profondeur)

- Dans les **rivières étroites** (largeur < 15m), la pêche doit se faire sur toute la largeur du cours d'eau, pour inclure les deux berges et le centre de la rivière. Néanmoins, sur les **rivières larges** (largeur  $\geq 15$  m), les pêcheurs doivent marcher lentement le long du cours d'eau, en **zig-zag** entre les deux berges ; ils doivent couvrir tous les habitants existants et faire sortir les poissons qui sont à couvert.

#### Dans les rivières profondes ( $\geq 0,8$ m de profondeur)

- La pêche électrique se fera UNIQUEMENT sur les berges puisque l'efficacité est extrêmement réduite dans les zones plus profondes, notamment si les espèces ciblées sont benthiques, comme c'est le cas de l'anguille.
- La pêche électrique à pied est limitée par la profondeur à laquelle elle peut se faire en toute sécurité. Il n'est pas recommandé de placer le rond d'anode à une profondeur telle que vous ne pourriez plus le voir.

#### 1.5. Données sur l'environnement à collecter sur le site

Pendant l'échantillonnage, les paramètres suivants doivent être mesurés et enregistrés **à chaque changement d'unité géomorphologique** :

- Profondeur (m) ;
- Vitesse du courant (m/s) ;
- Température de l'eau (°C) ;
- Conductivité ( $\mu\text{S}/\text{cm}$ ) ;
- Oxygène dissous (mg/l OU %) ;
- Le type de **substrat** et de **végétation sur les berges** et les refuges de poissons doivent également être enregistrés (format et classes, voir feuille de données type) ;
- La **surface** du site d'échantillonnage (m<sup>2</sup>) et les temps de pêche (min) doivent être enregistrés.

## 1.6. Données biologiques à collecter sur site pour chaque passage de poisson

Les données suivantes doivent être notées sur site pour chaque anguille :

- Longueur totale (mm) ;
- Poids total (0,01 g) ;
- Identification de la phase des anguilles (jaune ou argentée) par :

### 1. Inspection visuelle :

- présence d'une ligne latérale bien visible ;
- couleur du corps et contraste entre les parties dorsale et ventrale.



### 2. Pour tous les poissons au-dessus de 300-350 mm de longueur totale vous devez mesurer :

- Longueur de la nageoire pectorale ;
- Diamètres vertical et horizontal de l'œil (toujours l'œil gauche, à moins qu'il ne soit mal formé ou abîmé. Dans ce cas, utilisez l'œil droit et notez-le dans le champ d'observations) ;

La limite 300-350 mm doit être appréciée en fonction de la latitude. Elle correspond à la limite inférieure de taille à l'argenture pour les anguilles du sud de l'aire de distribution.

- Pour confirmer le stade de l'anguille argentée, utilisez le classement de Durif *et al.* (2009). Le **script R** pour calculer / identifier la phase d'anguille argentée est à la fin du protocole.



- Les autres poissons doivent également être identifiés et comptés (ainsi que *Procambarus clarkii*) à chaque passage.

## 1.7. Échantillons pour les analyses en laboratoire

### Protocole obligatoire

Pour atteindre les objectifs proposés dans le projet SUDOANG, **20 anguilles argentées et 60 anguilles jaunes/bassin pilote/an** doivent être capturées et analysées en laboratoire pour déterminer leur âge (*Protocole de préparation d'otolithe et lecture de l'âge*). L'**Échantillonnage d'anguilles jaunes** doit être **stratifié** pour couvrir toutes les tailles. Ces anguilles jaunes doivent être capturées dans les sites aval, milieu et amont de la zone de capture (20 anguilles de chaque zone = 60 anguilles) et représenter les tailles de chaque zone.

### Protocoles facultatifs

Si d'autres protocoles doivent être mis en place (*Protocole pour évaluer l'infestation par Anquillicola crassus et le taux de dégénération de la vessie gazeuse* et le *Protocole d'échantillonnage des gonades en vue d'évaluer le sex ratio*), les anguilles doivent être analysées aussi tôt que possible (de préférence encore fraîches).

Pour réduire les sacrifices animaux, les anguilles capturées pour déterminer l'âge doivent également être utilisées pour analyser l'infestation par *Anguilicola crassus*, seules les anguilles qui n'ont pas d'apparence distinctive du sexe masculin ou féminin doivent être utilisées pour évaluer le rapport de sexes (analyse moléculaire et histologique).

L'identification de chaque anguille ramenée au laboratoire et le site d'échantillonnage associé doivent être enregistrés et pouvoir être consultés à chaque analyse.

## 1.8. Équipement de terrain

- Appareil de pêche électrique (jusqu'à 1000 V) ;
- Anode et cathode ;
- Gants en caoutchouc ;
- Waders ;
- Épuisettes auxiliaires (3 unités) ;
- Conteneurs (seaux et viviers) pour collecter le poisson ;
- Règle et système d'échelle ;
- Balance de précision ;
- Sonde multi paramètre ;
- Courantomètre ;
- GPS et caméra ;
- Calibre numérique.

## 1.9. Script R pour identifier la phase d'anguilles argentées de Durif *et al.* (2009)

Le projet stacomi est un répertoire en accès libre (base de données Postgres, JAVA, R) pour traiter les informations de contrôle de la migration. L'une des méthodes de cours développées dans ce répertoire permet de calculer les stades d'argenture selon Durif.

Ce cours contient un ensemble de données avec le coefficient Durif et vous pouvez utiliser une fonction interne du répertoire pour calculer le stade. Pour utiliser la fonction `fun_stage_durif`, vous devez créer un ensemble de données avec des colonnes.

*Longueur du corps BL (mm)*

*Poids W (g)*

*Diamètre vertical de l'œil DV (mm)*

*Diamètre horizontale de l'œil Dh (mm)*

*Longueur de la nageoire pectorale FL (mm)*

nécessaire : (stacomiR)

```
# Télécharger les coefficients de données Durif
("coef_durif")

#####
# Pour utiliser manuellement la fonction fun_stage_durif,
# créer une matrice avec les colonnes "BL", "W", "Dv", "Dh", "FL"
#####
# Les données sont ici extraites manuellement
silver_eel<-as.matrix(r_silver@calcdatal[[1]][,c("BL","W","Dv","Dh","FL")])
head(silver_eel) # pour voir les premières lignes
#>      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
stage <- fun_stage_durif(silver_eel) # appliquer la fonction sur la matrice
stage[1:10] # chercher les 10 premiers éléments dans le vecteur silver
#> 25710 25711 25712 25713 25714 25715 25716 25717 25718 25719
#> "FIII" "FIII" "FIII" "FIV" "FIII" "FIII" "FV" "FV" "FIII" "FIII"
```

### Références

Durif C., Guibert, A., & Pierre, E. (2009). Morphological discrimination of the silverying 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.

Nom du site :				Code du site :	
Coordonnées GPS	Lat :	Long :	Système de coordonnées :	Date :	
Photos (réf.) :			Équipe :		

## Conditions atmosphériques

Température de l'air (1C) :					
Nébulosité :	<input type="checkbox"/> dégagé	<input type="checkbox"/> légèrement nuageux	<input type="checkbox"/> moyennement nuageux	<input type="checkbox"/> totalement nuageux	
Vent :	<input type="checkbox"/> nul	<input type="checkbox"/> léger	<input type="checkbox"/> modéré	<input type="checkbox"/> fort	
Pluie :	<input type="checkbox"/> oui	<input type="checkbox"/> non	Avant échantillonnage :		

## Objectif de l'échantillonnage

Sous-berge	Berge droite de rivière	0 % <input type="checkbox"/> absent	0%-25% <input type="checkbox"/> rare	25%-50% <input type="checkbox"/> intermédiaire	50%-75% <input type="checkbox"/> semi-continu	75%-100% <input type="checkbox"/> continu
	Berge gauche de rivière	<input type="checkbox"/> absent	<input type="checkbox"/> rare	<input type="checkbox"/> intermédiaire	<input type="checkbox"/> semi-continu	<input type="checkbox"/> continu
Végétation dans le lit de rivière	Macrophytes / hydrophytes	(0%) <input type="checkbox"/> absent	(0%-25%) <input type="checkbox"/> rare	(25%-75%) <input type="checkbox"/> intermédiaire	(75%-100%) <input type="checkbox"/> abondant	
	type dominant :	plantes supérieures		<input type="checkbox"/> mousse	<input type="checkbox"/> algues filamenteuses	
Grands débris de bois dans le lit de la rivière :	(0%) <input type="checkbox"/> absent	(0%-25%) <input type="checkbox"/> rare	(25%-75%) <input type="checkbox"/> intermédiaire	(75%-100%) <input type="checkbox"/> abondant		
Type de couverture de lit de rivière (choisissez ceux qui sont présents) :					Type dominant :	
<input type="checkbox"/> fines	<input type="checkbox"/> sable	<input type="checkbox"/> gravier (grain de café - œuf)	<input type="checkbox"/> petites pierres (A5 - A4)	<input type="checkbox"/> pierres plus grandes (A4 - A3)	<input type="checkbox"/> blocs / roches (> A3)	<input type="checkbox"/> dalle
Total abris : _____ %			Largeur de la rivière (moyenne - m) :			
Habitat : profond _____ %	plat _____ %	radier _____ %	Profondeur de la rivière (moyenne - m) :			

## Équipement d'échantillonnage

Type :	<input type="checkbox"/> batterie	<input type="checkbox"/> générateur dorsal	<input type="checkbox"/> générateur non dorsal
Courant électrique .	<input type="checkbox"/> pulsation (fréquence : _____ Hz)	<input type="checkbox"/> courant continu	<input type="checkbox"/> C. alternatif redressé <input type="checkbox"/> C. alternatif
Cathode :	<input type="checkbox"/> bague (diamètre : _____ cm)	<input type="checkbox"/> câble	<input type="checkbox"/> autre (lequel ?) :
Surface des épuisettes (m <sup>2</sup> ) :	ou longueur (cm) : largeur (cm) :		

<i>(début) (fin)</i> 1er passage : _____ H _____ - _____ H _____	<i>(début) (fin)</i> 2ème passage : _____ H _____ - _____ H _____ une demi-heure après le 1er passage	<i>(début) (fin)</i> 3ème passage : _____ H _____ - _____ H _____ uniquement si le 2ème a collecté plus d'indiv. que le 1er
---	---	---

Paramètres environnementaux	Paramètres environnementaux	Paramètres environnementaux
Température de l'eau (°C) ;	Température de l'eau (°C) ;	Température de l'eau (°C) ;
Oxygène dissous (mg/l OU %) ;	Oxygène dissous (mg/l OU %) ;	Oxygène dissous (mg/l OU %) ;
TDS (mg/L) :	TDS (mg/L) :	TDS (mg/L) :
Conductivité (µS/cm) :	Conductivité (µS/cm) :	Conductivité (µS/cm) :
Vitesse moyenne (m/s)	Vitesse moyenne (m/s)	Vitesse moyenne (m/s)

Paramètres d'échantillonnage	Paramètres d'échantillonnage	Paramètres d'échantillonnage
Surface pêchée (m <sup>2</sup> ) :		
Durée de pêche (min) :	Durée de pêche (min) :	Durée de pêche (min) :
Tension (V) :	Tension (V) :	Tension (V) :
Ampérage (A) :	Ampérage (A) :	Ampérage (A) :

## Remarques

--

Code du site :

Date :

Espèces	Nbre d'indiv. à chaque passage			Espèces	Nbre d'indiv. à chaque passage			Espèces	Nbre d'indiv. à chaque passage		
	1 <sup>er</sup>	2 <sup>ème</sup>	3 <sup>ème</sup>		1 <sup>er</sup>	2 <sup>ème</sup>	3 <sup>ème</sup>		1 <sup>er</sup>	2 <sup>ème</sup>	3 <sup>ème</sup>
<i>Acipenser baerii</i>				<i>Dicentrarchus labrax</i>				<i>Petromyzon marinus</i>			
<i>Abramis brama</i>				<i>Esox lucius</i>				<i>Phoxinus bigerri</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 holbrookii</i>				<i>Pimephales promelas</i>			
<i>Achondrostoma oligolepis</i>				<i>Gasterosteus aculeatus</i>				<i>Platichthys flesus</i>			
<i>Achondrostoma salmantinum</i>				<i>Gobio alvernae</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>Anaecypris 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 bearbensis</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 veticonica</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>							

**Code du site :**

Date :

## Données biométriques

(Longueur Totale - mm ; Poids Total- g (0,01g) ; Inspection visuelle : présence de Ligne Latérale Évidente – oui/non ; Couleur du Corps et Contraste entre parties dorsales et ventrales - oui/non ; si Anguille argentée ou Anguilles supérieures à 300/350 mm : Diamètre Oeil - Vertical, Diamètre Oeil - Horizontal, Longueur de Nageoire Pectorale - mm, Stade Argentée - Durif et al., 2009 ; Remarques : Relâchée - R ; Retenue pour Analyses postérieures - A)

## 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 *Anquillilcola crassus* y el Índice Degenerativo de la Vejiga Natatoria (SDI) y el Protocolo para el muestreo de góndadas 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.

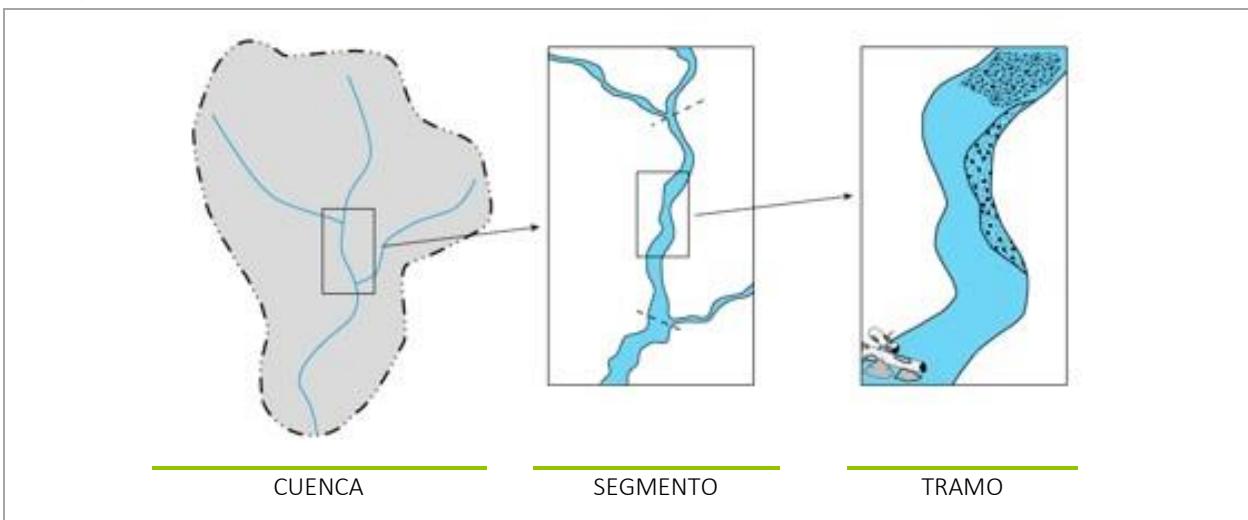


Figura 1. Representación esquemática de los términos utilizados en el protocolo.

**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** ( $> 300 \mu\text{S/cm}$ ); **800 V para conductividad media** ( $100 - 300 \mu\text{S/cm}$ ); **1.000 V para conductividad baja** ( $< 100 \mu\text{S/cm}$ ).

- 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 (~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 ≥ 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 (≥ 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 (°C);

- Conductividad ( $\mu\text{S}/\text{cm}$ );
- Oxígeno disuelto (mg/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 identificado 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 Anguillicola crassus y el Índice Degenerativo de la Vejiga Natatoria (SDI)* y *Protocolo para el muestreo de góndadas 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 *Anguillicola 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 [stacomi](#) 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(stacomiR)`

```
# 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.matrix(r_silver@calcdatal[[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.

# 1. Protocolo de muestreo de anguila amarilla y anguila plateada

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	0 %	0%-25%	25%-50%	50%-75%	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	(0%)	(0%-25%)	(25%-75%)	(75%-100%)	
	Tipo dominante:	<input type="checkbox"/> inexistentes	<input type="checkbox"/> escasos	<input type="checkbox"/> presencia media	<input type="checkbox"/> abundantes	
Residuos leñosos grandes en el lecho del río:	(0%)	(0%-25%)	(25%-75%)	(75%-100%)		
	<input type="checkbox"/> plantas superiores	<input type="checkbox"/> musgo	<input type="checkbox"/> algas filamentosas			
	<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):

Tipo dominante:

<input type="checkbox"/> limos	<input type="checkbox"/> arena	<input type="checkbox"/> grava (grano de café - huevo)	<input type="checkbox"/> piedras pequeñas (A5 - A4)	<input type="checkbox"/> piedras de mayor tamaño (A4 - A3)	<input type="checkbox"/> rocas	<input type="checkbox"/> losas (> 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	<input type="checkbox"/> generador dorsal	<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> ):	<input type="checkbox"/> longitud (cm):	anchura (cm):	

(inicio) <input type="text"/> H <input type="text"/> - <input type="text"/> H <input type="text"/> fin <b>1<sup>a</sup> pasada:</b> _____	(inicio) <input type="text"/> H <input type="text"/> - <input type="text"/> H <input type="text"/> fin <b>2<sup>a</sup> pasada:</b> _____ media hora después de la 1 <sup>a</sup> pasada	(inicio) <input type="text"/> H <input type="text"/> - <input type="text"/> H <input type="text"/> fin <b>3<sup>a</sup> pasada:</b> _____ solo si la 2 <sup>a</sup> pasada captura más ejemplares que la 1 <sup>a</sup>
--	--	---

## 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

Superficie de muestreo (m <sup>2</sup> ):	Parámetros de muestreo	Parámetros de muestreo
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

--

# 1. Protocolo de muestreo de anguila amarilla y anguila plateada

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 bigerri</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>Anaecypris 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 alvariensis</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 bearensis</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 veticonica</i>				<i>Micropterus salmoides</i>				<i>Triphophysa 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>							

## Código del lugar:

**Fecha:**

## Datos biométricos

(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;)

## 1. PROTOCOL FOR YELLOW AND SILVER EEL SAMPLING IN RIVERS

The following protocol describes the guidelines to conduct eel surveys to estimate density of yellow and silver eels at each pilot basin using electric fishing. In addition to presenting the criteria for establishing the location of sampling sites and procedures for conducting the fish surveys, this protocol also defines the methods to collect biometric information on eels, data on other fish species, and environmental variables.

Yellow and silver eels should be taken to the laboratory to implement other protocols. The *Protocol for otolith preparation and age reading* should be implemented to meet one of SUDOANG's objectives (**mandatory**), while the *Protocol to assess the infection by *Anquillilcola crassus* and the Swimbladder Degenerative Index (SDI)* and the *Protocol to sample gonads for sex ratio assessment*, are **facultative**.

### 1.1. Timing of surveys

Sampling to estimate the density of yellow and silver eels should be conducted in **late summer/early autumn** to ensure the capture of silver eels. Thus, it is expected that, depending on the location (latitude) of the river basin, sampling occurs when eels are already in a silver stage **BUT** before their escapement, which takes place in autumn/winter.

### 1.2. Site selection

Electric fishing will be conducted in each pilot basin, only in freshwater, both in the main river and in its tributaries (up to 3<sup>rd</sup> order tributaries). The **reach to be sampled should be representative of the river segment** covering existing physical diversity and containing at least one riffle if there is one in the segment. For a better understanding, a schematic representation and the definitions of the terms are presented.

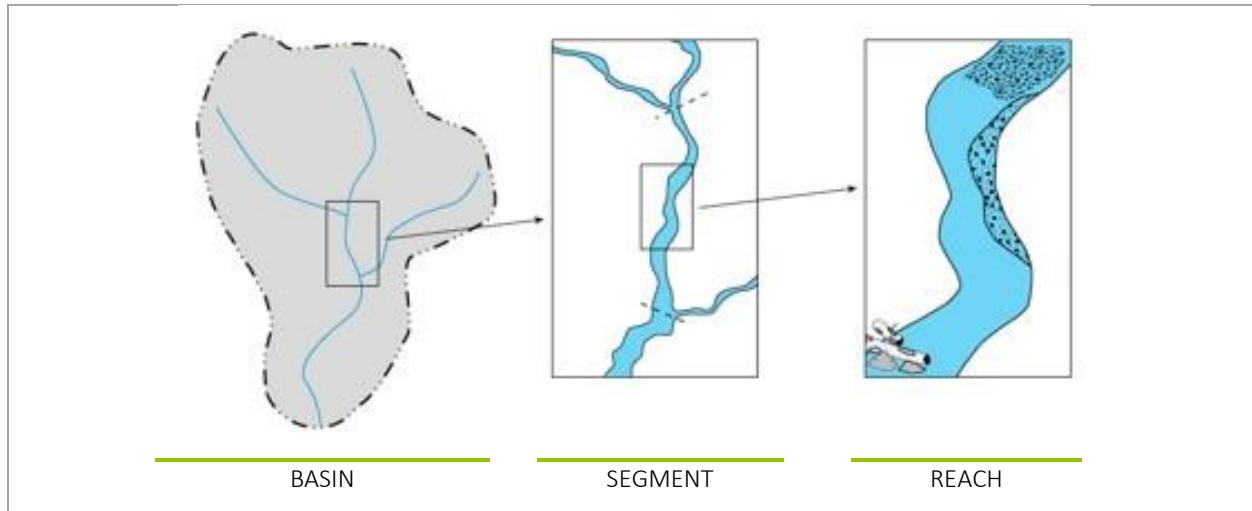


Figure 1. Schematic representation of terms used in the protocol.

**BASIN:** The entire watershed.

**SEGMENT:** section of a stream within the basin with similar biotic and physical properties (e.g. similar gradient and discharge).

**REACH:** A section of a stream within a segment from where biological data will be collected.

Sampling reaches should be **photographed** and **georeferenced** with a GPS, so that they can be recognized.

One possible criteria to **define** the **number and location** of sampling sites that are representative of the river segment, is presented. Three steps should be followed:

**1. Divide the river basin in hydrological segments**

- Changes in gradient, discharge (tributary confluences) and/or disturbance (reservoirs) will be used to establish segments;
  - If gradient type is repeated, then the longest segment or the one that best represents the downstream stream gradient will be used;
  - If stream gradient is very low, then changes in discharge (tributary confluences) will be used to designate segments;
  - If gradient is low and there are no tributaries, segments will be placed at equal distances from each other;
- Segments should not be placed in reservoirs.

**2. Measure every hydrological segment**

- Segments >10 km in length can be divided according to the slope into minimum, medium and maximum
  - Slope indicates the stream gradient, which in turn influences sediment transport and discharge characteristics.
  - Slope is defined as the difference in elevation at the upstream ( $Elv_{Upstr}$ ) and elevation at the downstream ( $Elv_{Dowstr}$ ) ends of a stream segment, divided by the length of that segment ( $Length_{seg}$ ):

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

**3. Place sampling reaches within a segment**

- A reach will have to be placed in the centre of a gradient or discharge segment and should be representative of that segment.

- If a **segment** is less than 60 km in length, the number of reaches should be as follows:

Length	Number of reaches
30-60 km	3
11-29 km (< 30)	2
1-9 km (< 10)	0 - 1

- If the **segment length** is equal to or greater than 60 km place one reach per each 20 km as follows:

Length	Number of reaches
60 km	3
80 km	4
100 km	5

### 1.3. Length of the sampling reach

Spatial scale is a critical aspect in any sampling protocol. Regardless of where sampling takes place, the vast majority of species likely to be present in the range of the electric field should be captured within this length of the stream. To standardize the fishing protocol the sampled reach length should be defined. The following lengths should be adopted:

Stream Type	Length of reach	Minimum	Maximum
Wadeable Stream	20 times the wetted stream width	100 m	300 m
Non-wadeable Stream	10 times the wetted stream width	300 m	500 m

### 1.4. Sampling procedures

Fish sampling will be conducted by electrofishing. The conductivity will determine the initial voltage setting selected. It is recommended to select the following voltages as maximum values, depending on the water conductivity: **400 V** for **high conductivity** (> 300 µS/cm); **800 V** for **medium conductivity** (100 - 300 µS/cm); **1000 V** for **low conductivity** (< 100 µS/cm).

- A team of at least four (4) people is desirable. One (1) operator carrying the anode and three (3) carrying auxiliary dip nets to capture any stunned or fleeing fish, and place them in a bucket. Fish should be removed as soon as possible from the electrical field.
- It is recommended to use **Direct current (DC)** because it is less harmful to fish and mortality and injury of fish needs to be kept to a minimum (voltage and intensity must be recorded).
- When **sweeping**, you should do the sampling by leaving the **anode 30 s in the water** and then release the button, **OR**, in areas of high density, leave the anode until fish are attracted; The anode should move in a circular way (~1m diameter). The mesh size of the anode should be small enough (1-2 mm x 1-2 mm) to retain eels of all ranges.

- Per sampling reach, **at least 2 passes** should be done with **an interval of 30 min between them**. If the **2<sup>nd</sup> pass collects more individuals than the 1<sup>st</sup>**, **a 3<sup>rd</sup> pass should be conducted**, again with an interval of 30 min. The quantity of eels caught in each pass should be recorded separately.
- **After each pass**, all eels sampled should be **measured** and **weighted** as soon as possible. Bycatch should be identified, and the number of individuals recorded. All specimens captured in successive passes should be kept in a container placed in the river (equipped with a cover and small openings allowing the water renewal but preventing small fish escape) until the end of sampling, and should only be returned to the water at the end of all biometric measurements.
- Regardless of the depth of the reach (see below) fishing should **ALWAYS be conducted** in an **upstream direction**. Fishing should be carried out differently depending on the river depth:

#### **In shallow rivers (< 0.8 m depth)**

- In **narrow rivers** (width < 15 m), fishing should be carried out across the entire river, aiming to include both margins and the centre of the river. However, in **wide rivers** (width ≥ 15 m), fishers should walk slowly along the upstream course, describing a **zig-zag** between the two margins, while covering all existing habitats and taking out the fish that are sheltered.

#### **In deep rivers (≥ 0.8 m depth)**

- The electrofishing will be carried out **ONLY** in the margins because efficiency is extremely reduced in deeper areas, especially if the target species is benthic, as it is the case with the eel.
- Electric fishing by wading is limited to the depth at which wading can be safely carried out. It is not advisable to place the anode head deeper than you can see.

### **1.5. Environmental data to collect in the field**

During sampling, the following parameters should be measured and recorded **whenever the habitat changes**:

- Depth (m);
- Current speed (m/s);
- Water temperature (°C);
- Conductivity (µS/cm);
- Dissolved oxygen (mg/L OR %);
- The type of **substrate** and of **vegetation in the margins** and **instream cover** should also be recorded (format and classes in Data template);
- Also, the **area** sampled (m<sup>2</sup>), and the **sampling time** (min) should be recorded.

### **1.6. Biological data to collect in the field at each fish pass**

The following data should be recorded in the field for each eel:

- Total length (mm);
- Total weight (0.01 g);

- Identification of the phase of the eels (yellow or silver) by:

**1. Visual inspection:**

- presence of a conspicuous lateral line;
- body color and contrast between dorsal and ventral parts.



**2. For silver eels and all eels with length larger than 300/350 mm, you should measure:**

- Length of pectoral fin;
- Vertical and horizontal diameters of the eye (always **left eye**, unless malformed or defective. In such case, the right eye should be used, but this information should be noted in the observations field);

The limit 300/350 mm should be assessed according to the latitude. It corresponds to the lower silvering size limit for eels in the southern distribution range.

- To confirm the silver eel stage, you should use the classification by Durif et al., (2009). The R script to calculate/identify the silver eel stage is in the end of the protocol.



- Bycatch should also be identified and counted (Fish species and *Procambarus clarkii*) at each pass.

## 1.7. Samples for laboratory analysis

### Mandatory protocol

To meet the objectives proposed in the SUDOANG project, **20 silver eels and 60 yellow eels/pilot basin/year** should be collected and analyzed in the laboratory for age determination (*Protocol for otolith preparation and age reading*). The **sample of yellow eels** should be **stratified** to cover all sizes and therefore, increase the variety of ages. These yellow eels should be taken from the lower, middle and upper reaches of the catchment (20 eels from each area=60 eels) and be representative of the sizes at each area.

## Facultative protocols

If other protocols are to be implemented (Protocol to assess the infection by *Anguillicola crassus* and the Swimbladder Degenerative Index and the Protocol to sample gonads for sex ratio assessment), eels should be analyzed as soon as possible (preferably still fresh).

To reduce animal sacrifice, eels collected for age determination should also be used for the analysis of *Anguillicola crassus* infection, whereas only eels that do not have a typical male or female appearance, should be used to assess sex ratio (molecular and histological analysis).

The identification of each eel taken to the laboratory and location of sampling should be recorded and kept constant for all analyses.

### 1.8. Field equipment

- Electrofishing apparatus (up to 1000 V);
- Anode and cathode;
- Rubber gloves;
- Waders;
- Auxiliary dip nets (3x);
- Containers (e.g. buckets) to place the fish collected;
- Ruler and scale;
- Precision balance;
- Multiparametric probe;
- Current meter;
- GPS and camera;
- Digital calliper.

## 1.9. R script to identify the silver eel stage from Durif *et al.* (2009)

The [stacomis](#) project is an open access bundle (Postgres database, JAVA, R) to treat migration monitoring information. One of the class method developed in this package allows to calculate Durif's stages.

This class contains a dataset with Durif coefficient, and you can use some internal function from the package to calculate stage. To use the function `fun_stage_durif` you need to create a dataset with columns

`Body Length BL (mm)`

`Weight W (g)`

`Vertical eye diameter Dv (mm)`

`Horizontal eye diameter Dh (mm)`

`Pectoral fin Length FL (mm)`

```
require(stacomisR)

# Load the coefficients from Durif
data("coef_durif")

#####
# To use the function fun_stage_durif manually
# create a matrix with columns BL", "W", "Dv", "Dh", "FL"
#####
# here it is extracted from the data at hand
silver_eel<-as.matrix(r_silver@calcdatas[[1]][,c("BL", "W", "Dv", "Dh", "FL")])
head(silver_eel) # to see the first lines
#>      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
stage <- fun_stage_durif(silver_eel) # apply the function to the matrix
stage[1:10] # Look at the first 10 elements in vector silver
#> 25710 25711 25712 25713 25714 25715 25716 25717 25718 25719
#> "FIII" "FIII" "FIII" "FIV" "FIII" "FIII" "FV" "FV" "FIII" "FIII"
```

## References

- Durif C., Guibert, A., & 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.

# 1. Yellow and Silver Eel Sampling

<b>Site name:</b>			<b>Site code:</b>	
GPS Coordinates	Lat:	Long:	Coordinate system:	Date:
Photos (ref):			Team:	

## Atmospheric conditions

Air temperature (°C):				
Nebulosity:	<input type="checkbox"/> clear	<input type="checkbox"/> slightly cloudy	<input type="checkbox"/> averagely cloudy	<input type="checkbox"/> fully cloudy
Wind:	<input type="checkbox"/> null	<input type="checkbox"/> light	<input type="checkbox"/> moderate	<input type="checkbox"/> strong
Rain:	<input type="checkbox"/> yes	<input type="checkbox"/> no	Before sampling:	

## Sampling reach

River Gallery	Right river bank	0 %	0%-25%	25%-50%	50%-75%	75%-100%		
		<input type="checkbox"/> absent	<input type="checkbox"/> sparse	<input type="checkbox"/> intermediate	<input type="checkbox"/> semi-continuous	<input type="checkbox"/> continuous		
Vegetation in river bed	Left river bank	<input type="checkbox"/> absent	<input type="checkbox"/> sparse	<input type="checkbox"/> intermediate	<input type="checkbox"/> semi-continuous	<input type="checkbox"/> continuous		
	Macrophytes / hydrophytes	(0%)	(0%-25%)	(25%-75%)	(75%-100%)			
	dominant type:	<input type="checkbox"/> absent	<input type="checkbox"/> sparse	<input type="checkbox"/> intermediate	<input type="checkbox"/> abundant			
		<input type="checkbox"/> higher plants	<input type="checkbox"/> moss	<input type="checkbox"/> filamentous algae				
Large woody debris in river bed:		(0%)	(0%-25%)	(25%-75%)	(75%-100%)			
Large woody debris in river bed:					<input type="checkbox"/> absent	<input type="checkbox"/> sparse	<input type="checkbox"/> intermediate	<input type="checkbox"/> abundant
Type of river bed cover (choose the ones that are present):					Dominant type:			
<input type="checkbox"/> mud	<input type="checkbox"/> sand	<input type="checkbox"/> gravel	<input type="checkbox"/> small stones	<input type="checkbox"/> bigger stones	<input type="checkbox"/> blocks/ rocks	<input type="checkbox"/> flagstone		
(coffee grain - egg)			(A5 - A4)	(A4 - A3)	(> A3)			
Total instream cover: _____ %					River width (average - m):			
Habitat:	Pool _____ %	Run _____ %	Riffle _____ %	River depth (average - m):				

## Sampling equipment

Type:	<input type="checkbox"/> battery	<input type="checkbox"/> dorsal generator	<input type="checkbox"/> non-dorsal generator
Electric current:	<input type="checkbox"/> pulse (frequency: _____ Hz)	<input type="checkbox"/> DC	<input type="checkbox"/> PDC
Cathode:	<input type="checkbox"/> ring (diameter: _____ cm)	<input type="checkbox"/> cable	<input type="checkbox"/> other (which?):
Fishing net area (m <sup>2</sup> ):	or length (cm): width (cm):		

(start) _____ (end) _____ <b>1st pass:</b> _____ H _____ - _____ H _____	(start) _____ (end) _____ <b>2nd pass:</b> _____ H _____ - _____ H _____ half hour after 1 <sup>st</sup> pass	(start) _____ (end) _____ <b>3rd pass:</b> _____ H _____ - _____ H _____ only if 2 <sup>nd</sup> pass collects more indiv. than 1 <sup>st</sup>
---	---	---

<b>Environmental parameters</b>	<b>Environmental parameters</b>	<b>Environmental parameters</b>
Water temperature (°C):	Water temperature (°C):	Water temperature (°C):
Dissolved oxygen (mg/L or %):	Dissolved oxygen (mg/L or %):	Dissolved oxygen (mg/L or %):
TDS (mg/L):	TDS (mg/L):	TDS (mg/L):
Conductivity (µS/cm):	Conductivity (µS/cm):	Conductivity (µS/cm):
Current speed (m/s):	Current speed (m/s):	Current speed (m/s):

<b>Sampling parameters</b>	<b>Sampling parameters</b>	<b>Sampling parameters</b>
Sampling area (m <sup>2</sup> ):		
Fishing time (min):	Fishing time (min):	Fishing time (min):
Voltage (V):	Voltage (V):	Voltage (V):
Amperage (A):	Amperage (A):	Amperage (A):

## Remarks

--

# 1. Yellow and Silver Eel Sampling

Site code:

Date:

Species	Nr. indiv. in each pass			Species	Nr. indiv. in each pass			Species	Nr. indiv. in each pass		
	1 <sup>st</sup>	2 <sup>nd</sup>	3 <sup>rd</sup>		1 <sup>st</sup>	2 <sup>nd</sup>	3 <sup>rd</sup>		1 <sup>st</sup>	2 <sup>nd</sup>	3 <sup>rd</sup>
<i>Acipenser baerii</i>				<i>Dicentrarchus labrax</i>				<i>Petromyzon marinus</i>			
<i>Abramis brama</i>				<i>Esox lucius</i>				<i>Phoxinus bigerri</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>Anaecypris 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 alvariensis</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 bearensis</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 veticonica</i>				<i>Micropterus salmoides</i>				<i>Triphophysa 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>							

Site code:

Date:

## Biometric data

(Total Length - mm; Total Weight - g (0.01g); **Visual inspection:** presence of a *Conspicuous Lateral Line* – yes/no; **Body Color and Contrast between dorsal and ventral parts**- yes/no; **If Silver eel AND if eels > 300/350 mm:** Eye Diameter-Vertical, Eye Diameter-Horizontal, Pectoral Fin Length – mm, **Silver Stage** – Durif et al., 2009; **Remarks:** Released - R; Retained for further Analyses - A)

## 2. PROTOCOLO PARA ESTIMATIVA DO RECRUTAMENTO DE ENGUIAS DE VIDRO

O objetivo deste protocolo é desenvolver um método padronizado para calcular um índice de recrutamento de enguia de vidro/meixão, usando uma arte de pesca (rede ou armadilha), de preferência na foz dos rios, isto é, em zonas sem pressões antropogénicas. Este método também tem a finalidade de proporcionar uma estimativa quantitativa do recrutamento de meixão para cada bacia hidrográfica, para que os níveis de recrutamento entre bacias possam ser comparáveis. Espera-se que este protocolo possa ser aplicável a outras bacias hidrográficas em toda a zona SUDOE, de modo a fornecer um índice de recrutamento a nível nacional.

As condições ambientais nas 10 bacias-piloto incluídas no projeto SUDOANG são diferentes. As bacias em contacto com o Oceano Atlântico são fortemente influenciadas pelas marés, contrariamente ao registado no Mar Mediterrâneo, onde essa influência é mínima e o meixão entra no rio migrando em contra-corrente. Os métodos usados para realizar a amostragem de meixão e estimativa de recrutamento devem, portanto, ser ajustados às condições do local. Porém, independentemente do método escolhido para realizar a amostragem de meixão, o objetivo é registar/ obter um determinado número de enguias de vidro por volume de água (no caso de bacias hidrográficas influenciadas por marés) ou por secção do rio (no caso de bacias hidrográficas que drenam para o Mediterrâneo).

As enguias de vidro utilizam o transporte seletivo da maré para poupar energia. Assim, na costa Atlântica, onde existe a influência das marés, as enguias de vidro devem ser capturadas durante a maré enchente. No Mediterrâneo, onde a maré tem menos influência sobre a atividade das enguias de vidro, o vento desempenha um papel fundamental no processo de recrutamento.

### 2.1. Época de amostragem

A pesca deve ser realizada **mensalmente** durante o **período de maior intensidade migratória** (idealmente 6 meses). A amostragem deve ser efetuada no **Dia de Lua Nova**. Se as condições meteorológicas não forem favoráveis à pesca, esta deve ser realizada o mais tardar 2 dias após o Dia de Lua Nova. No caso das bacias piloto que desaguam no Atlântico, a amostragem deve ser conduzida durante a **maré enchente** do período da **noite**. Nas bacias hidrográficas que desaguam no Mediterrâneo, a amostragem deve ser realizada de noite, à mesma hora, ou quando as águas estão no nível mais elevado, caso se considere que essas condições são suscetíveis de influenciar as capturas. Em qualquer dos casos, o protocolo de amostragem deve ser estabelecido após a execução de ensaios iniciais, no primeiro ano, e mantido, a longo prazo, de modo a garantir a recolha padronizada de dados para estabelecimento de uma série de recrutamento.

### 2.2. Escolha do local

O **local de pesca** deve localizar-se o mais próximo possível do mar, para evitar a influência de outros pescadores, caso exista uma atividade piscatória nesse local.

### 2.3. Métodos de amostragem

- A arte de pesca deve ser, de preferência, a que é normalmente usada por pescadores ou, em alternativa, outra que já tenha sido usada.

- Deverá utilizar-se um crivo para separar o meixão dos outros organismos;
- Quando são capturadas 50 ou menos enguias de vidro, estas devem ser todas transportadas para o laboratório. Quando são capturadas mais de 50 enguias de vidro, deve-se recolher uma subamostra de 50 indivíduos para análise.
- Os parâmetros da água devem ser medidos no início e no fim do período de pesca. Se a pesca for contínua, serão suficientes dois registos (início e fim da pesca). Se a amostragem for realizada de forma repetida, as medições devem ser registadas em intervalos regulares, isto é, cada vez que seja realizada a amostragem.
- **Na área Atlântica:**
  - A amostragem deve começar no início da maré enchente e estender-se até que esta termine.
  - É necessário registar o valor do fluxómetro no início e no fim da amostragem;
  - Deve registar-se o número de enguias de vidro por volume de água;
  - Se a pesca for realizada de forma contínua durante toda a maré enchente, será necessário registar o valor do fluxómetro, no início e no fim da amostragem, assim como o número de enguias de vidro por volume de água;
  - Se a amostragem puder ser realizada de forma repetida em intervalos periódicos durante toda a maré enchente, deverá ser registado o valor do fluxómetro no início e no fim de cada ocasião, de forma separada; as enguias de vidro devem ser igualmente capturadas e armazenadas de forma separada em cada ocasião.
  - No final da pesca, os 50 indivíduos guardados para análise em laboratório devem ser retirados em proporções idênticas de cada intervalo de amostragem;
  - Deve ser ainda registada a secção transversal da área do rio e a velocidade média da água, para calcular o volume total do fluxo da água no local.
- **Na área Mediterrânea:**
  - A amostragem deve durar o tempo suficiente para cobrir o pico de migração noturna.
  - No caso de estar a ser usada uma nassa (ou outro aparelho de amostragem similar), deve ser registada a superfície da secção transversal coberta por esta armadilha, bem como a largura do rio no local onde se encontra a armadilha. Se possível, deverão realizar-se ensaios de marcação-recaptura para estimar a eficiência da armadilha;
  - No caso de ser usada uma passagem com dispositivo de captura, a eficácia da passagem deve ser determinada, quer realizando ensaios de marcação-recaptura, quer efetuando arrastos (bongo tows) para medir a densidade das enguias de vidro na água (protocolo similar ao protocolo da área Atlântica).

## 2.4. Dados ambientais a recolher no campo

Devem ser registadas as seguintes variáveis ambientais:

- Data e hora em que é efetuada a pesca;
- Hora da maré e altura;

- Profundidade;
- Temperatura da água e salinidade ou condutividade (água salobra ou doce) – usando *Data Loggers* ou Garrafas de *Van Dorn*/Garrafas de *Niskin*;
- Data do dia da Lua Nova;
- Caudais ao longo da largura do curso de água e no local das armadilhas;
- Duração do período de pesca.

## 2.5. Procedimentos laboratoriais

As amostras enviadas para o laboratório devem ser mantidas no frigorífico, em recipientes com água, para serem analisadas o mais rapidamente possível.

Uma vez no laboratório, as enguias de vidro devem ser colocadas em papel para remover o excesso de água, e registados os seguintes dados:

- Comprimento do indivíduo (mm);
- Peso do indivíduo (0,01g);
- Estádio de pigmentação (segundo a classificação de Briand, 2009).

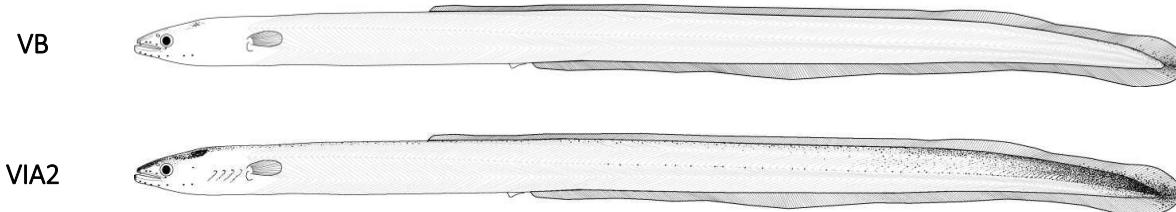
## 2.6. Equipamento de campo

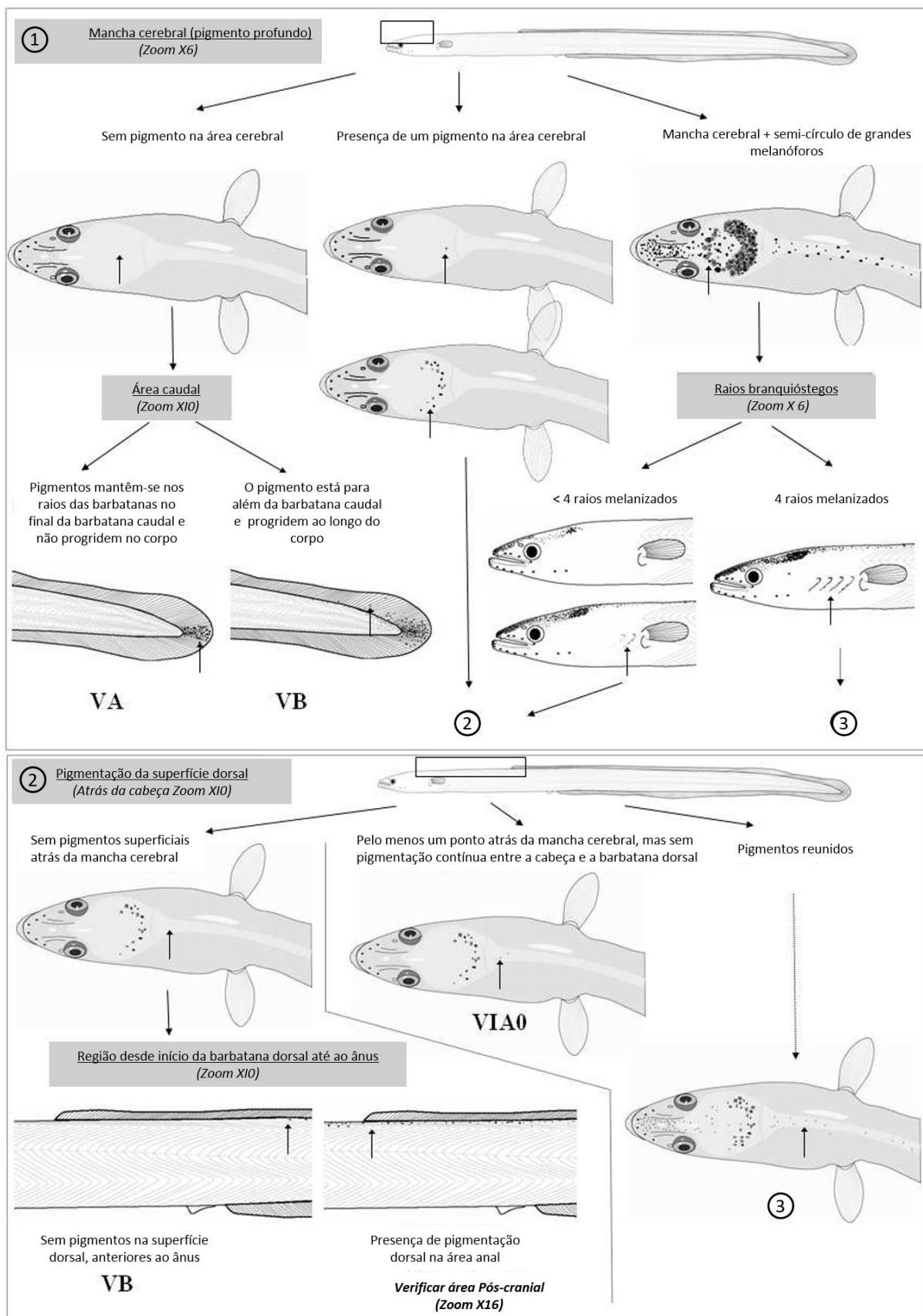
- Rede/armadilha;
- GPS;
- Fluxómetro;
- Crivo;
- Garrafas de *Van Dorn* ou *Niskin* ou ainda, Sondas multiparâmetros.

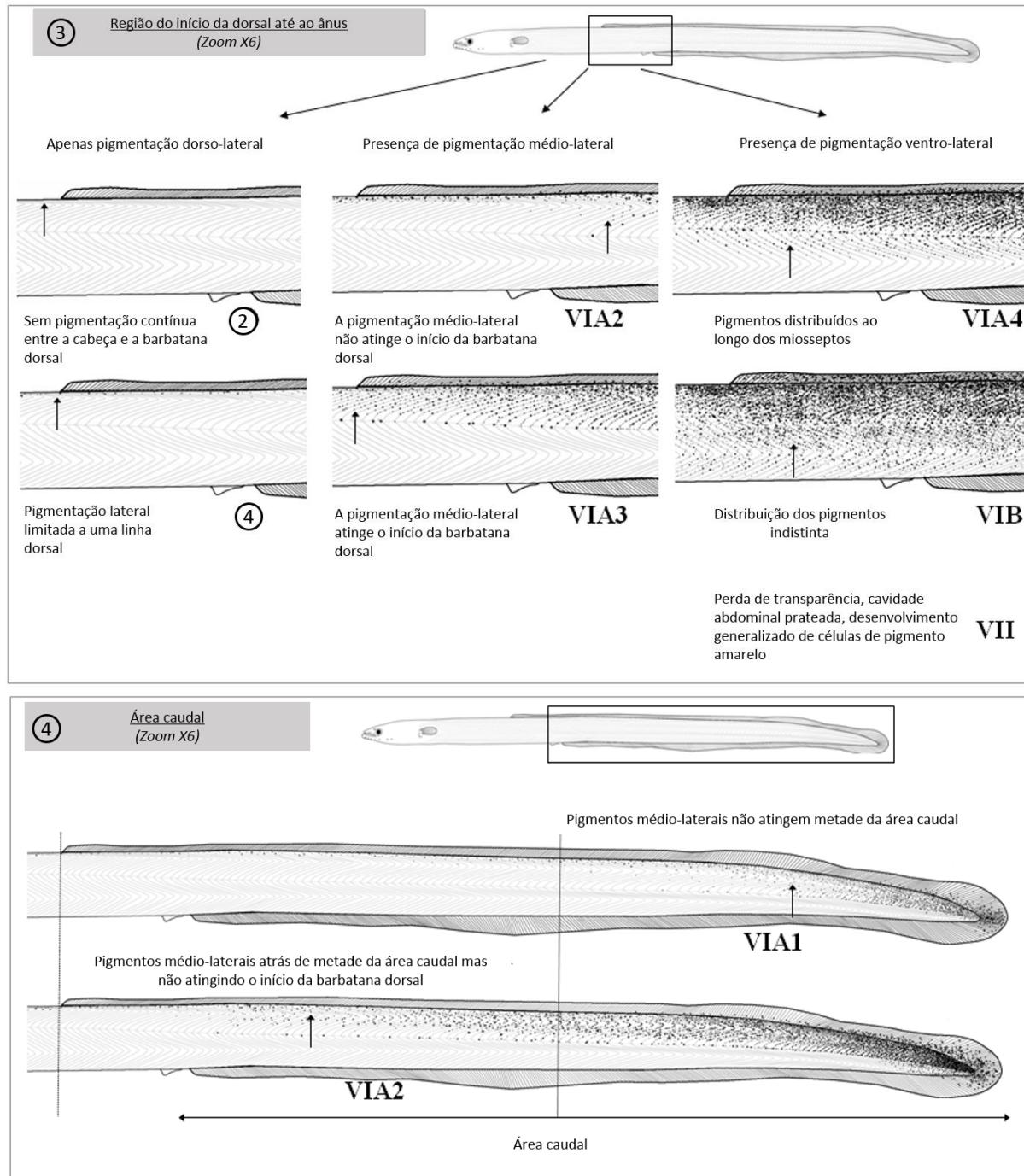
## 2.7. Estados de pigmentação

A identificação dos estados de pigmentação deve basear-se na classificação de Briand (2009).

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







## Referências

- Briand C. 2009. Dynamique de population et de migration des civelles en estuaire de Vilaine. PhD thesis, Agrocampus Ouest. Rennes, France. 207p.
- Elie P., R. Lecomte-Finiger, I. Cantrelle and N. Charlton. 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. PhD Thesis, Université de Perpignan, France.
- Strubberg A.C. 1913. The metamorphosis of elvers as influenced by outward conditions. Meddelester fra Kommissionen for Havundersøgesler, serie Fiskeri Copenhagen 4: 1–11.

## 2. Recrutamento de Enguias de vidro

<b>Nome do local:</b>	<b>Código do local:</b>		
Coordenadas GPS	Lat:	Long:	Sistema de coordenadas:
Data:	Data da lua nova;		Horas: (início - fim) ___ H ___ - ___ H ___
Fotos (ref):	Equipa:		

### Condições atmosféricas

Temperatura do ar (°C):				
Nebulosidade:	<input type="checkbox"/> limpo	<input type="checkbox"/> pouco nublado	<input type="checkbox"/> parcialmente nublado	<input type="checkbox"/> muito nublado
Vento:	<input type="checkbox"/> nulo	<input type="checkbox"/> fraco	<input type="checkbox"/> moderado	<input type="checkbox"/> forte
Chuva:	<input type="checkbox"/> sim	<input type="checkbox"/> não	Antes da amostragem:	

### Secção de amostragem

Tempo total de pesca (min):	Hora da maré: ___ H ___	Altura da maré (m):
Área de abertura da rede de pesca (m <sup>2</sup> ):	Largura do rio (média – m):	

### Condições ambientais *SE A PESCA FOR CONTÍNUA* (caso contrário, preencher dados da página seguinte)

	<i>Início</i>	<i>Fim</i>		<i>Início</i>	<i>Fim</i>
Hora:	___ H ___	___ H ___	Condutividade (µS/cm):		
Temperatura da água (°C):			TDS (mg/L):		
Salinidade:			Profundidade (m):		
Fluxómetro:					

Observações (Descrever o método de pesca usado, incluindo tipo de arte/ armadilha de pesca)

## 2. Recrutamento de Enguias de vidro

Pág. \_\_\_/\_\_\_

Código do local:

Data:

Dados de amostragem **SE A PESCA NÃO FOR CONTÍNUA**

(Replicados - 20 minutos cada; Temperatura água - °C; Salinidade; Condutividade - µS/cm; TDS - mg/L; Profundidade - m; Peso total pescado - g (0,01g); Sub-amostra - g (0,01g)

Repl. N.º	Horas	Fluxómetro	Parâmetros ambientais					Peso total	Sub-amostra	Observações
			Tª água (°C)	Salinidade	Cond (µS/cm)	TDS (mg/L):	Prof. (m);			
Início										
	Fim									
Início										
	Fim									
Início										
	Fim									
Início										
	Fim									
Início										
	Fim									
Início										
	Fim									
Início										
	Fim									
Início										
	Fim									
Início										
	Fim									
Início										
	Fim									
Início										
	Fim									
Início										
	Fim									
Início										
	Fim									
Início										
	Fim									

## Dados biométricos

(Comprimento Total - mm; Peso Total - g (0.01g); Estado pigmentação – ver protocolo):

## 2. PROTOCOLE D'ESTIMATION DU RECRUTEMENT DES CIVELLES

L'objectif de ce protocole est de développer une méthode standardisée de calcul du taux de migration des civelles en utilisant un appareil de pêche (un filet ou un piège), de préférence en embouchure de rivière, c'est-à-dire non influencé par la pression anthropogénique. L'autre objectif de la méthode est de fournir une estimation de la migration des civelles pour chaque capture de telle sorte que les niveaux de migration puissent être comparés entre les bassins. Nous espérons que l'utilisation de ce protocole s'étende à d'autres endroits dans la région du SUDOE, pour fournir un taux de migration national.

Les conditions dans les 10 bassins pilotes couverts par le projet SUDOANG sont différentes. Les bassins en contact avec l'Océan Atlantique sont largement influencés par la marée, au contraire de la Mer Méditerranée où la marée est faible et où les civelles entrent à contre-courant lors de la migration en rivière. Les méthodes d'échantillonnage des civelles et d'estimation de la migration doivent par conséquent être ajustées aux conditions locales. Néanmoins, indépendamment de la méthode choisie pour l'échantillonnage des civelles, l'objectif est d'enregistrer/obtenir un certain nombre de civelles par volume d'eau (dans le cas des bassins de rivières influencés par la marée) ou par section transversale (dans le cas des bassins de rivière débouchant dans la Mer Méditerranée).

Les civelles utilisent le transport sélectif de la marée pour économiser de l'énergie. Par conséquent, sur la côte atlantique où l'influence de la marée est plus forte, les civelles doivent être capturées à marée montante. En Mer Méditerranée, où la marée a moins d'impact sur l'activité des civelles, le vent joue un rôle important dans le processus de migration.

### 2.1. Programmation des campagnes

La pêche doit se faire **tous les mois** pendant la **période de migration la plus intense** (idéalement 6 mois). L'échantillonnage doit se faire un jour de **Nouvelle lune**. Si les conditions météorologiques ne sont pas favorables à la pêche, la capture peut avoir lieu au maximum 2 jours avant ou après le jour de nouvelle lune, **avec une préférence pour les jours où le coefficient de marée est le plus élevé**. Dans les bassins pilotes qui débouchent en Atlantique, l'échantillonnage doit toujours se faire à **marée montante de nuit**. Pour les captures dans les cours d'eau qui débouchent en Mer Méditerranée, l'échantillonnage doit se faire à des heures similaires de la nuit ou au moment où le niveau d'eau est le plus haut si ces conditions ont une influence sur les captures. Dans tous les cas, le protocole d'échantillonnage doit être défini après la réalisation d'expériences initiales à mener pendant la première année et maintenu à long terme pour assurer une prise standardisée des données pour une série de migration.

### 2.2. Sélection du site

Le **site de pêche** doit être aussi proche de la mer que possible, pour éviter l'influence d'autres pêcheurs s'il y en a.

### 2.3. Procédures d'échantillonnage

- Le matériel de pêche doit être de préférence celui utilisé par les pêcheurs ou d'autres qui ont déjà été utilisés ;
- Utilisez un tamis pour séparer les civelles d'autres organismes ;
- Lorsque vous aurez capturé 50 civelles ou moins, elles peuvent être transférées au laboratoire. Si vous avez capturé plus de 50 civelles, un sous-échantillon de 50 civelles doit être conservé pour analyse ;
- Les paramètres de l'eau (voir § 2.4) doivent être mesurés au début et à la fin de chaque période de pêche. Si la pêche se fait en continu, deux paramètres doivent être notés (au début et à la fin de la pêche). Si l'échantillonnage est réalisé à plusieurs reprises, les mesures doivent être enregistrées à des intervalles réguliers, c'est-à-dire à chaque nouvel échantillonnage.
- Dans la **Zone atlantique** :
  - Les échantillonnages doivent commencer au début de la marée montante et se prolonger jusqu'à la fin.
  - Il est nécessaire d'enregistrer la valeur du débitmètre en début et en fin d'échantillonnage ;
  - Le nombre de civelles par volume d'eau doit être noté ;
  - Si la pêche est continue pendant toute la marée montante, il est nécessaire d'enregistrer la valeur du débitmètre en début et à la fin de l'échantillonnage, ainsi que le nombre de civelles par volume d'eau ;
  - Si l'échantillonnage peut être réalisé de manière répété à intervalles réguliers pendant toute la marée montante, la valeur du débitmètre en début et à la fin de chaque occasion doit être notée séparément ; les civelles doivent également être collectées et stockées séparément à chaque occasion ;
  - À la fin de la pêche, les 50 civelles à retenir pour l'analyse en laboratoire doivent être réparties de manière uniforme sur toute la durée de l'échantillonnage ;
  - La largeur de la rivière et la vitesse moyenne de l'eau doivent être connues pour estimer le volume global d'eau s'écoulant dans la rivière.
- En **Mer Méditerranée** :
  - L'échantillonnage doit durer assez longtemps pour couvrir le pic de migration nocturne.
  - Si un verreux (ou un appareil d'échantillonnage similaire) est utilisé, la surface transversale échantillonnée par ce piège doit être enregistrée, et la largeur mouillée globale à l'endroit du piège doit être mesurée. Si possible des expériences de Capture-Marquage-Recapture peuvent être faites pour estimer l'efficacité du piège ;
  - Si une passe-piège est utilisée, l'efficacité de la passe doit être vérifiée, soit en faisant des expériences de C-M-R soit avec des filets bongos pour obtenir une mesure de densité des civelles dans l'eau (protocole similaire à celui de la zone atlantique) ;

### 2.4. Données sur l'environnement à collecter sur le site

Les variables environnementales suivantes doivent également être enregistrées :

- Date et heure de la pêche ;
- Heure de la marée et hauteur ;
- Profondeur ;

- Température de l'eau et salinité ou conductivité (eau saumâtre ou eau douce) - par enregistreurs de données ou bouteilles Van Dorn / Niskin ;
- Date du jour de nouvelle lune ;
- Débit dans toute la largeur du cours d'eau et sur les sites des pièges ;
- Durée de la période de pêche.

## 2.5. Procédures en laboratoire

Les échantillons emportés au laboratoire doivent être conservés dans l'eau de capture au réfrigérateur pour être analysés le plus vite possible.

En laboratoire les données suivantes doivent être prises :

- Longueur de l'individu (mm) ;
- Poids de l'individu (0,01 g) ; les civelles doivent être gentiment essorées sur du papier absorbant pour éliminer l'eau avant la pesée ;
- Stade de pigmentation (Selon le classement de Briand, 2009), voir § 2.7.

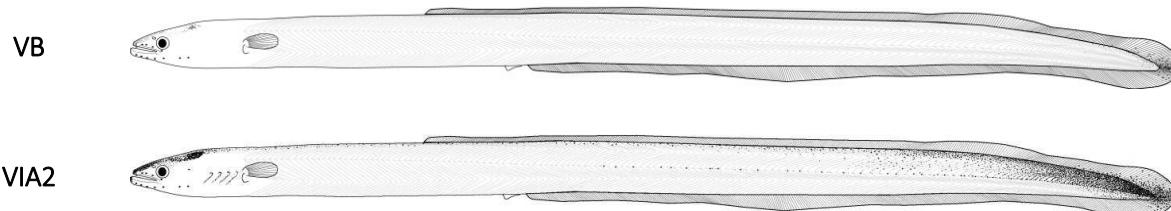
## 2.6. Équipement sur site

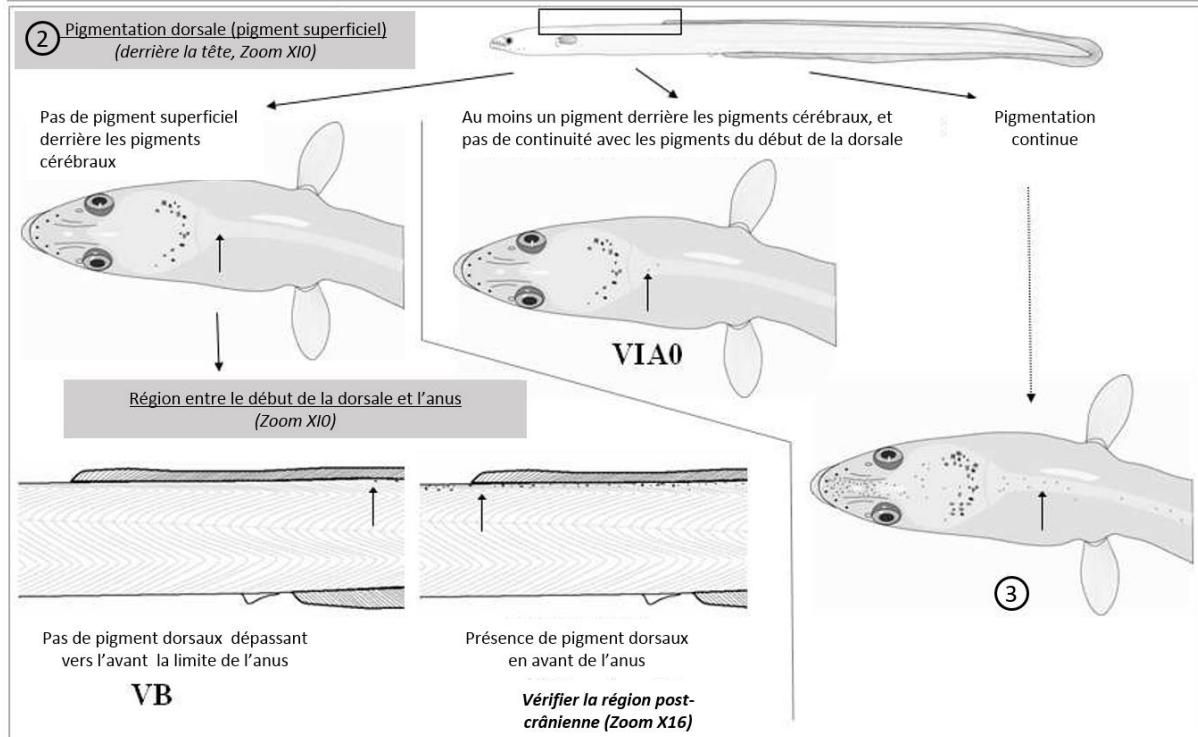
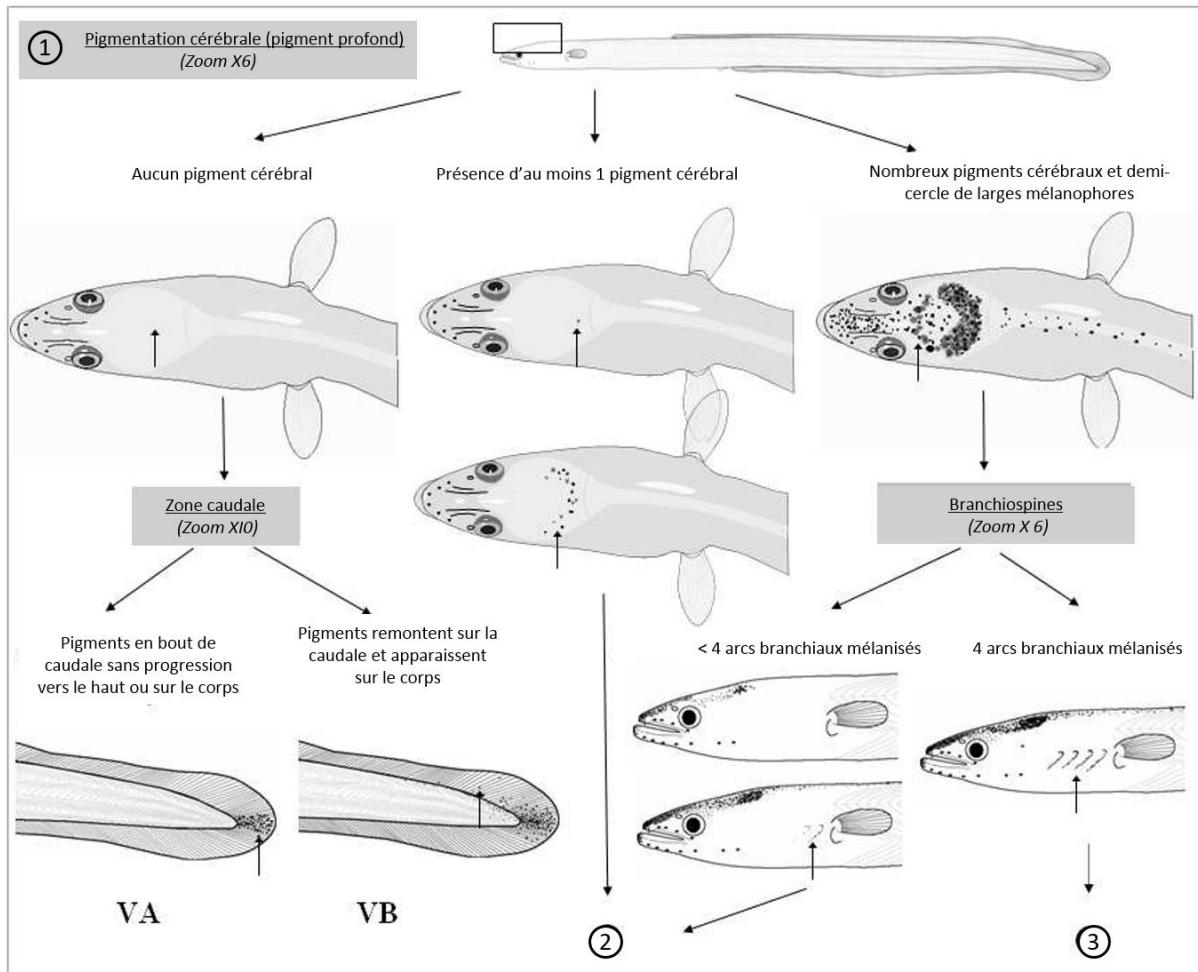
- Filet / piége ;
- GPS ;
- Débitmètre ;
- Tamis ;
- Van Dorn ou bouteilles Niskin ou enregistreur de données.

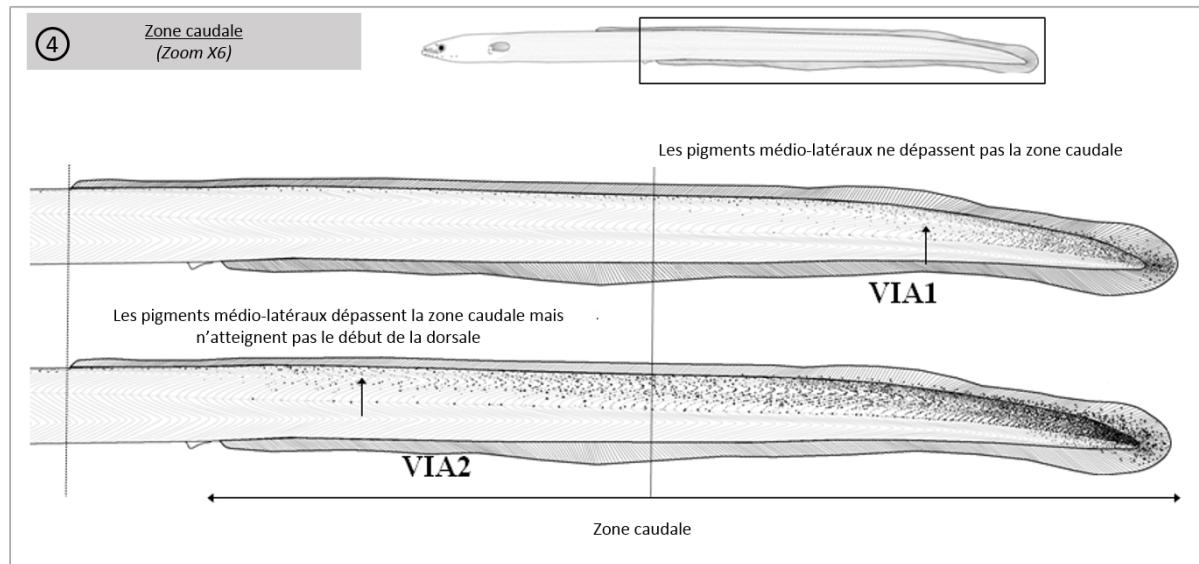
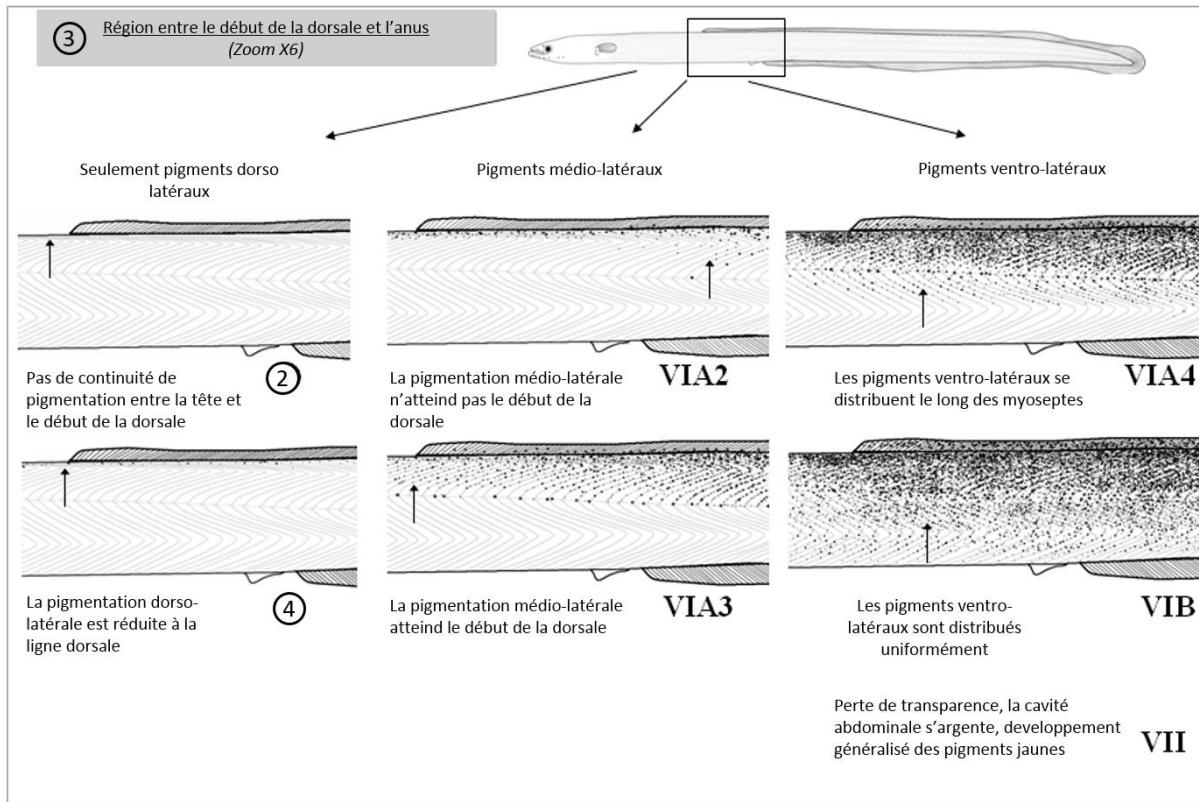
## 2.7. Stades pigmentaires

Les stades pigmentaires doivent être identifiés selon le classement de Briand (2009).

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







## Références

- Briand C. 2009. Dynamique de population et de migration des civelles en estuaire de Vilaine. PhD thesis, Agrocampus Ouest. Rennes, France. 207p.
- Elie P., R. Lecomte-Finiger, I. Cantrelle and 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*, L. 1758, des milieux lagunaires méditerranéens du golfe du Lion: Narbonnais et Roussillon. PhD Thesis, Université de Perpignan, France.
- Strubberg A.C. 1913 The metamorphosis of elvers as influenced by outward conditions. Meddelester fra Kommissionen for Havundersøgesler, serie Fiskeri Copenhagen 4: 1-11.

<b>Nom du site :</b>			<b>Code du site :</b>
Coordonnées GPS	Lat :	Long :	Système de coordonnées :
Date :		Date du jour de nouvelle lune ;	Heures : (début - fin) ___ H ___ - ___ H ___
Photos (réf.) :			Équipe :

### Conditions atmosphériques

Température de l'air (1C) :			
Nébulosité :	<input type="checkbox"/> dégagé	<input type="checkbox"/> légèrement nuageux	<input type="checkbox"/> moyennement nuageux
Vent :	<input type="checkbox"/> nul	<input type="checkbox"/> léger	<input type="checkbox"/> modéré
Pluie :	<input type="checkbox"/> oui	<input type="checkbox"/> non	Avant échantillonnage :

### Section d'échantillonnage

Durée totale de la pêche (minutes) :	Heure de marée : ___ H ___	Hauteur de la marée (m) :
Surface d'ouverture de filet de pêche (m <sup>2</sup> ) :		Largeur de la rivière (moyenne - m) :

Conditions environnementales **DANS LE CAS DE PÊCHE CONTINUE** (si ce n'est pas le cas, remplissez la page suivante)

Début	Fin	Début	Fin
Heure :	___ H ___	Conductivité (µS/cm) :	
Température de l'eau (°C)		TDS (mg/L) :	
;			
Salinité :		Profondeur (m) :	
Débitmètre :			

**Remarques** (veuillez décrire la méthode de pêche, dont le type de filet de pêche / piège)

## 2. Recrutement des civelles

Code du site :

Date :

Données de l'échantillonnage **SI LA PÊCHE N'EST PAS CONTINUE**

(Répétitions- 20 minutes chacune ; Température de l'eau- °C ; Salinité ; Conductivité - µS/cm ; TDS (Total solides dissous) - mg/L ; Profondeur – m ; Poids Total pêché – 0,01g ; Sous-échantillon – 0,01g)

Rép. Nbre	Heures	Débitmètre	Paramètres environnementaux					PT	Sous-échantillon	Remarques
			Temp (°C)	Salinité	Cond (µS/cm)	TDS (mg/L)	Profondeur (m)			
Début										
Fin										
Début										
Fin										
Début										
Fin										
Début										
Fin										
Début										
Fin										
Début										
Fin										
Début										
Fin										
Début										
Fin										
Début										
Fin										

## Données biométriques

(Longueur Total – mm ; Poids Total - 0,01g ; Stade pigmentaire - voir protocole)

## 2. PROTOCOL TO ESTIMATE GLASS EEL RECRUITMENT

The aim of this protocol is to develop a standard method to calculate a glass eel recruitment index using a fishing gear (a net or a trap), preferably at the river mouth, i.e., not influenced by any anthropogenic pressure. The method also aims to provide a quantitative estimate of the glass eel recruitment for each catchment so that the levels of recruitment can be compared among basins. It is hoped that the use of this protocol could be extended to other catchments throughout the SUDOE area, to provide a nationwide recruitment index.

The conditions in the 10 pilot basins covered by the SUDOANG project are different. The basins contacting the Atlantic Ocean are strongly influenced by the tide, unlike the Mediterranean Sea where there is little tide and glass eels enter the river migrating against the current. The methods to sample glass eels and estimate recruitment have therefore, to be adjusted to the local conditions. However, regardless of the method chosen to sample glass eels, the objective is to record/ obtain a number of glass eels per volume of water (in the case of river basins influenced by the tide) or cross-section (in the case of river basins draining into the Mediterranean).

Glass eels use selective tidal transport to save energy. Hence, in the Atlantic coast, where there is the influence of the tide, glass eels should be caught during the flood tide. In the Mediterranean, where the tide influences the activity of glass eels to a lesser extent, the wind plays an important role in the recruitment process.

### 2.1. Timing of surveys

The fishery should be conducted **monthly** during the more **intense migration period** (ideally 6 months). Sampling should be performed in **New Moon Day**. If the weather conditions are not favourable to fishing, the fishery can be done up to a maximum of 2 days following the New Moon Day. In pilot basins that flow into the Atlantic, sampling should always be conducted during the **night flood tide**. In the catchments flowing into the Mediterranean, sampling should be conducted at similar hours of the night or around the highest water level if those conditions are considered to influence catches. In any case, the sampling protocol should be set after the initial experiments carried out during the first year and maintained in the long term to ensure the standardized collection of data for a recruitment series.

### 2.2. Site selection

The **fishing location** should be as close to the sea as possible, to avoid the influence of other fishermen, in case there is a fishery.

### 2.3. Sampling procedures

- The fishing gear should be preferably the one used by fishermen or other that has already been used;
- A sieve should be used to separate glass eels from other organisms;

- When 50 or fewer eels are caught they should be taken to the laboratory. When more than 50 glass eels are caught, a subsample of 50 glass eels should be kept for analysis;
- Water parameters should be measured at the beginning and end of each fishing period. If fishing is continuous, two records will be enough (beginning and end of fishing). If sampling is conducted repeatedly, measures should be recorded at regular intervals, i.e., at each sampling occasion.
- In the **Atlantic area**:
  - Sampling should start at the beginning of the flood tide and last until the end;
  - It is necessary to record the value of the flowmeter at the beginning and at the end of sampling;
  - The number of glass eels per volume of water should be recorded;
  - If fishing is continuous during the entire flood tide, it is necessary to record the value of the flowmeter at the beginning and at the end of sampling, and also the number of glass eels per volume of water;
  - If sampling can be conducted repeatedly at regular intervals during the entire flood tide, then the value of the flowmeter at the beginning and at the end of each occasion should be recorded separately; Glass eels should also be collected and stored separately on each occasion;
  - At the end of fishing, the 50 glass eels to retain for laboratory analysis should be equally distributed throughout the time intervals of sampling;
  - The cross-sectional area of the river and average water velocity should be provided to estimate the overall volume of water flowing in the river.
- In the **Mediterranean area**:
  - The sampling should last long enough to cover the night peak migration.
  - If a fyke-net (or similar sampling gear) is used, the cross-sectional surface sampled by this trap should be recorded, and the overall cross-sectional river at the location of the trap should be measured. If possible, tag-recapture experiments can be carried out to estimate the efficiency of the trap;
  - If a ladder trap is used, the efficiency of the ladder should be assessed, either by carrying mark-recapture experiments or by carrying out bongo tows to provide a measure of glass eel densities in water (protocol similar to the Atlantic area protocol);

## 2.4. Environmental data to collect in the field

The following environmental variables should also be recorded:

- Date and time of fishing;
- Tide hour and height;
- Depth;
- Water temperature and salinity or conductivity (brackish water or freshwater) – via data loggers or Van Dorn Bottles/Niskin Bottles;
- Date of New Moon day;
- Flow rates across the stream width and at trap sites;
- Length of fishing period.

## 2.5. Laboratory procedures

Samples taken to the laboratory should be kept in water in the refrigerator, to be analysed as quickly as possible.

In the lab, the glass eels should be placed in paper to remove extra water, and the following data should be recorded:

- Individual length (mm);
- Individual weight (0.01g);
- Pigmentation stage (according to the classification from Briand, 2009).

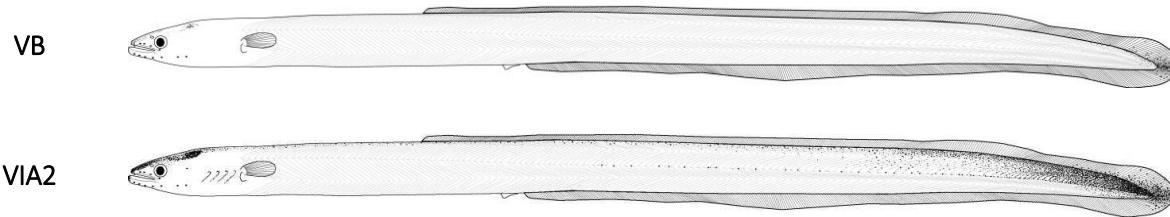
## 2.6. Field Equipment

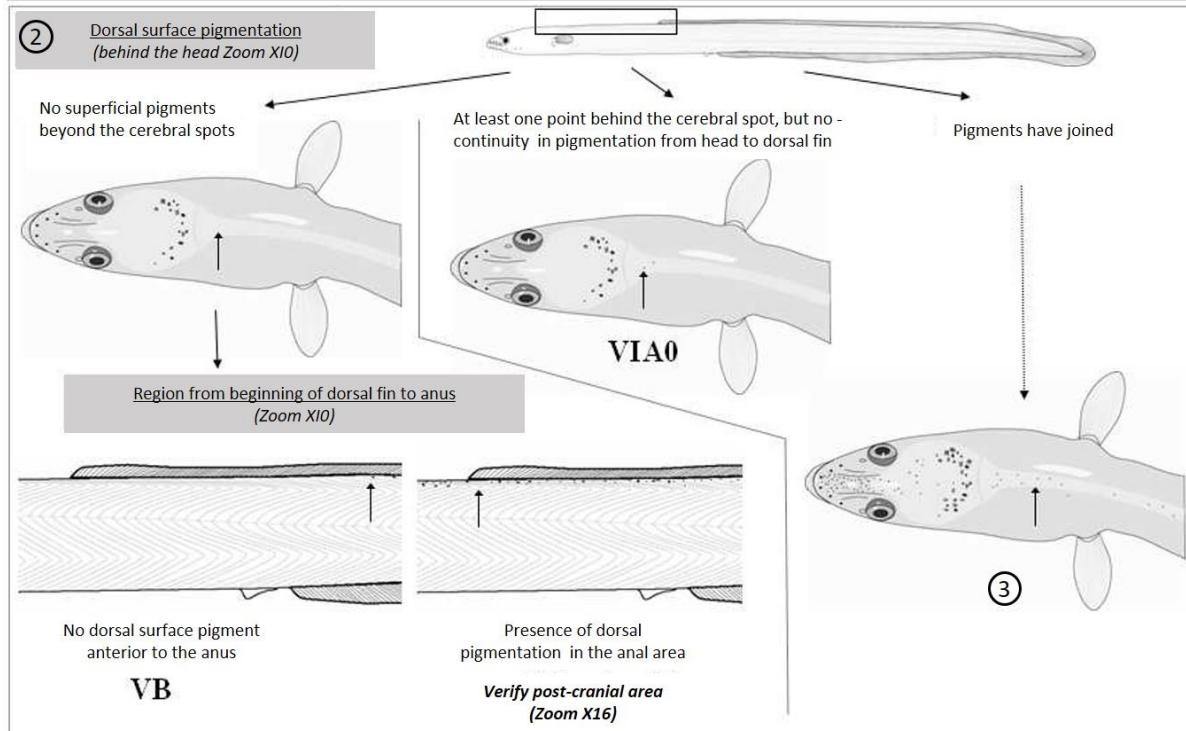
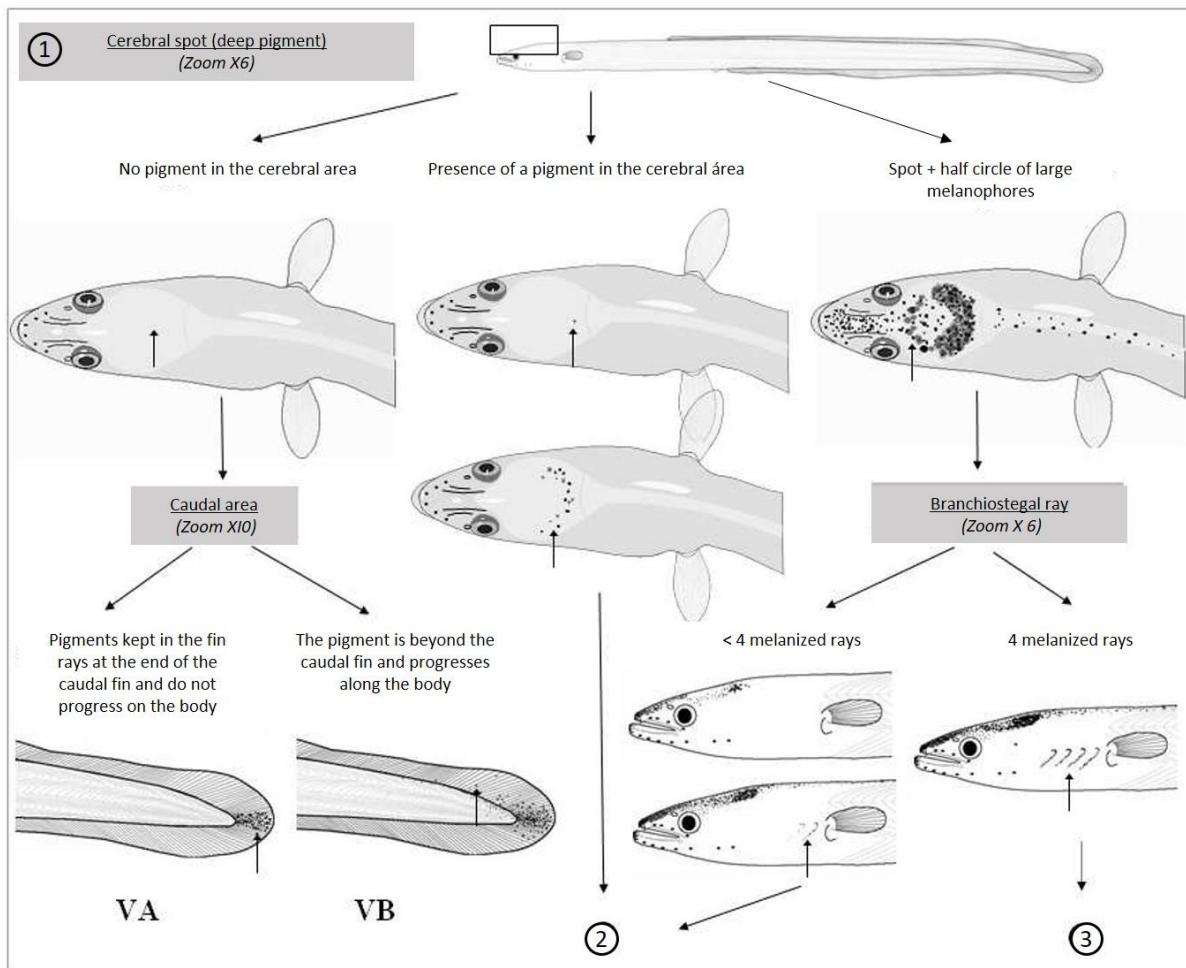
- Net/trap;
- GPS;
- Flowmeter;
- Sieve;
- Van Dorn or Niskin Bottles or Data logger.

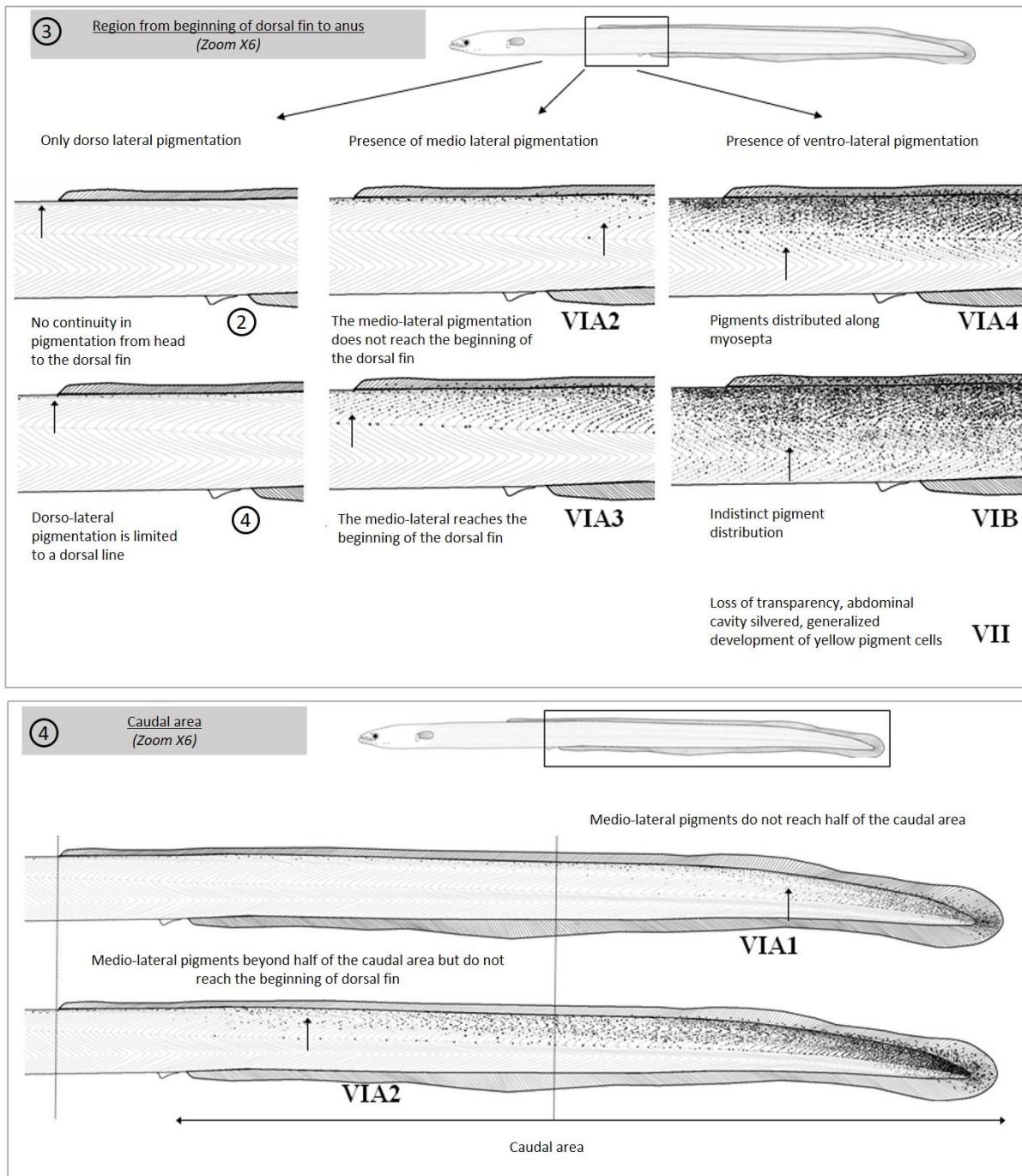
## 2.7. Pigmentation stages

The identification of pigmentation stages should follow the classification by Briand (2009).

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







## References

- Briand C. 2009. Dynamique de population et de migration des civelles en estuaire de Vilaine. PhD thesis, Agrocampus Ouest. Rennes, France. 207p.
- Elie P., R. Lecomte-Finiger, I. Cantrelle and N. Charlton. 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. PhD Thesis, Université de Perpignan, France.
- Strubberg A.C. 1913. The metamorphosis of elvers as influenced by outward conditions. Meddelester fra Kommissionen for Havundersøgelsler, serie Fiskeri Copenhagen 4: 1–11.

## 2. Glass Eel Recruitment

<b>Site name:</b>			<b>Site code:</b>
GPS Coordinates	Lat:	Long:	Coordinate system:
Date:	Date of New Moon:		Hours: (start - end) ___ H ___ - ___ H ___
Photos (ref):	Team:		

### Atmospheric conditions

Air temperature (°C):			
Nebulosity:	<input type="checkbox"/> clear	<input type="checkbox"/> slightly cloudy	<input type="checkbox"/> averagely cloudy
Wind:	<input type="checkbox"/> null	<input type="checkbox"/> light	<input type="checkbox"/> moderate
Rain:	<input type="checkbox"/> yes	<input type="checkbox"/> no	Before sampling:

### Sampling section

Total fishing time (minutes):	Tide hour: ___ H ___	Tide height (m):
Fishing net opening area (m <sup>2</sup> ):	River width (average - m):	

### Environmental conditions *IF CONTINUOUS FISHING* (if not, fill in next page)

	Start	End	
Hour:	___ H ___	___ H ___	Conductivity (µS/cm):
Water temperature (°C):			TDS (mg/L):
Salinity:			Depth (m):
Flowmeter:			

**Remarks** (please describe the fishing method, including the type of fishing net/ trap)

## 2. Glass Eel Recruitment

Site code:

Date:

**Sampling data *IF NOT CONTINUOUS FISHING***
*(Replicates - 20 minutes each; Water Temperature - °C; Salinity; Conductivity - µS/cm; TDS - mg/L; Depth – m; Total Weight fished – 0,01g; Sub-sample – 0,01g)*

Repl. Nr.	Hours	Flowmeter	Environmental parameters					TW (g)	Sub-sample (g)	Remarks
			WT (°C)	Salinity	Cond (µS/cm)	TDS (mg/L)	Depth (m)			
Start										
	End									
Start										
	End									
Start										
	End									
Start										
	End									
Start										
	End									
Start										
	End									
Start										
	End									
Start										
	End									
Start										
	End									
Start										
	End									
Start										
	End									
Start										
	End									
Start										
	End									
Start										
	End									

## Biometric data

(Total Length - mm; Total Weight - 0.01g; Pigmentation stage - see protocol)

## 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 **marea nocturna**. En las cuencas que desemboquen 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).

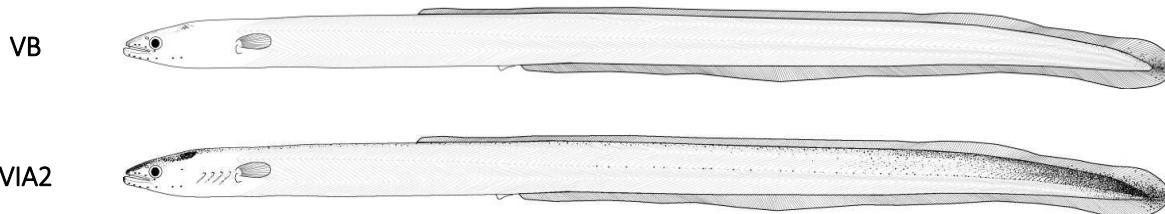
## 2.6. Equipo de campo

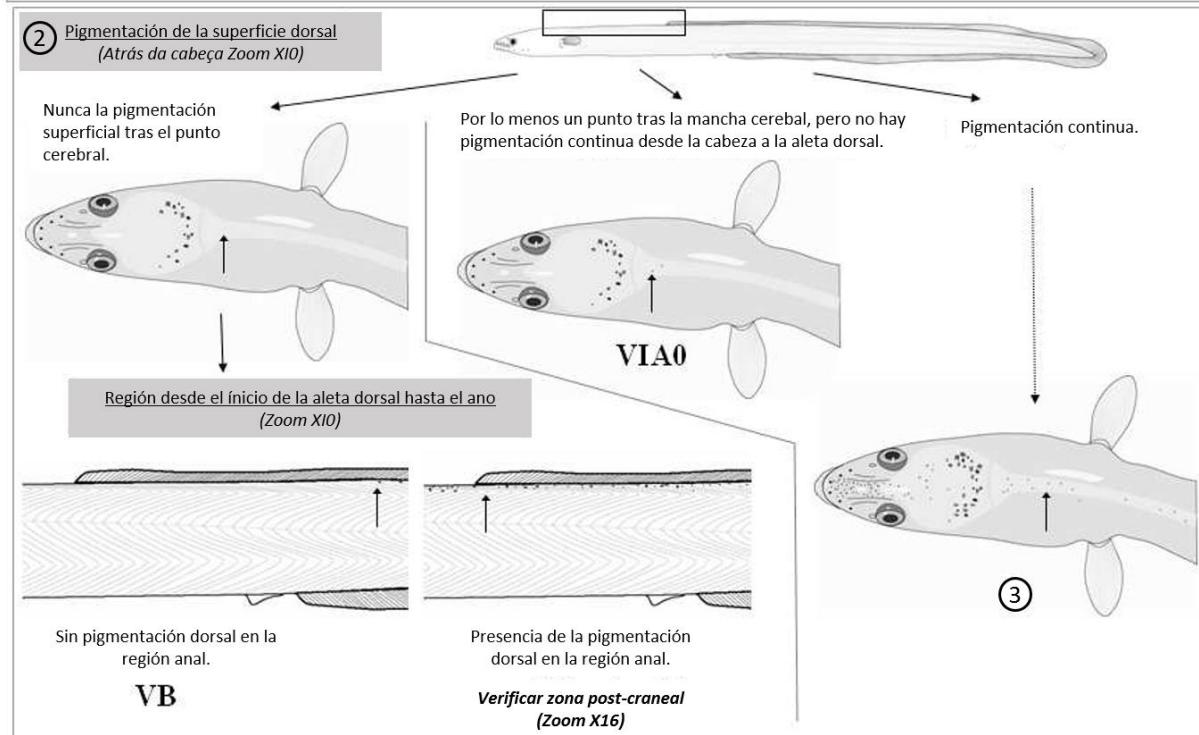
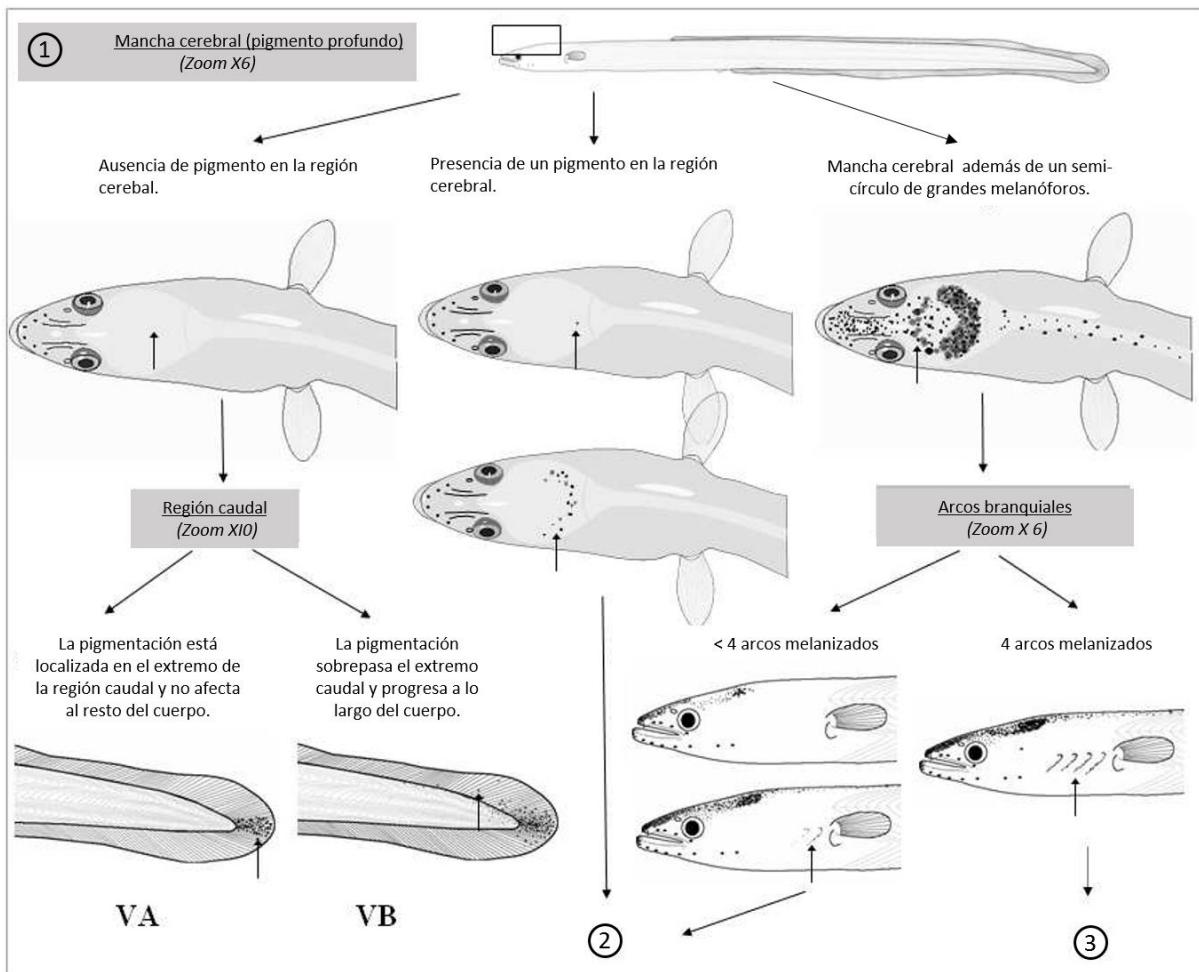
- Red/nasa;
- GPS;
- Flujómetro;
- Tamiz;
- Botellas Van Dorn o Niskin o registrador de datos.

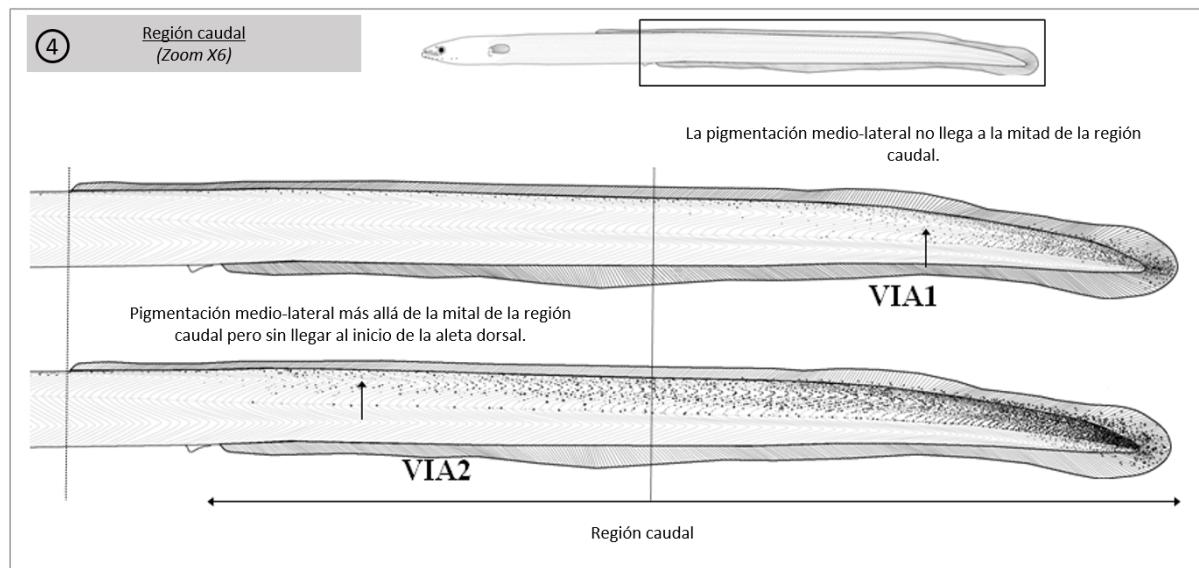
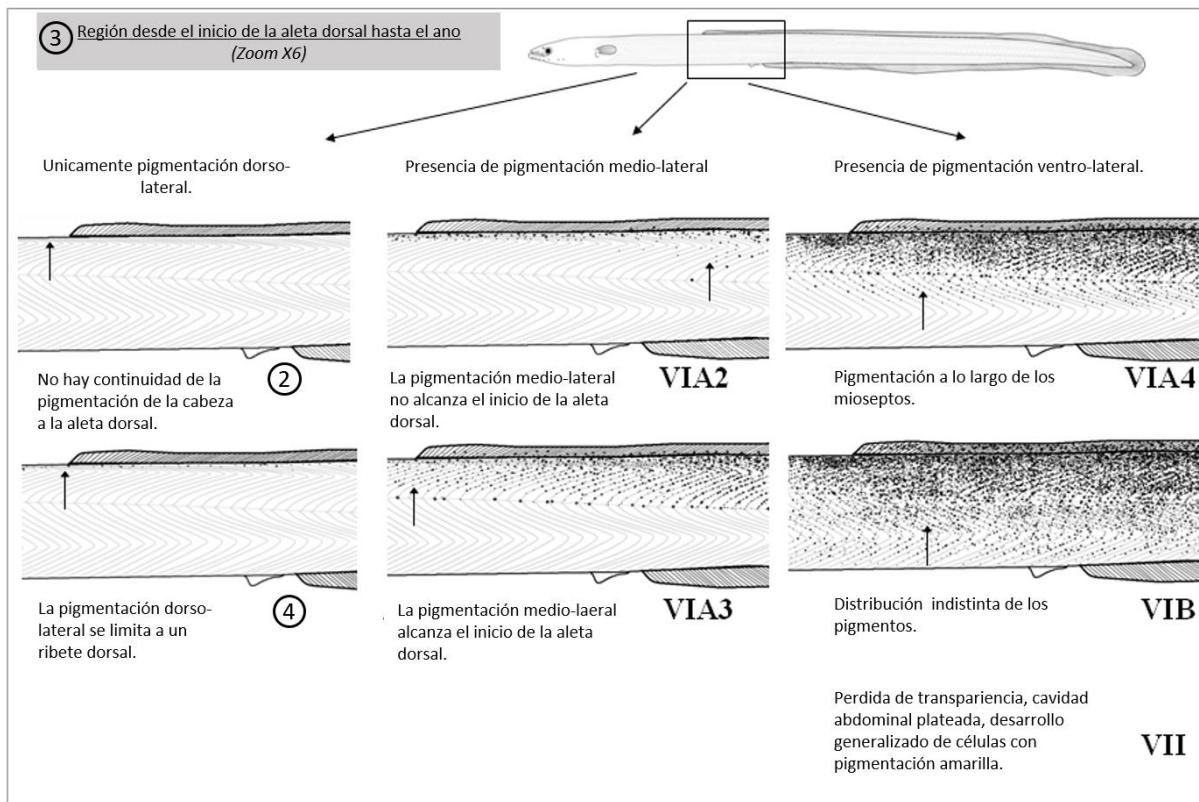
## 2.7. Fases de pigmentación

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).







## 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.

## 2. Reclutamiento de la angula

<b>Nombre del lugar:</b>			<b>Código del lugar:</b>
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
Viento:	<input type="checkbox"/> ninguno	<input type="checkbox"/> ligero	<input type="checkbox"/> moderado
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 (m <sup>2</sup> ):		Anchura del río (media - m):

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

	<i>Inicio</i>	<i>Fin</i>		<i>Inicio</i>	<i>Fin</i>
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 - µS/cm; TDS - mg/L; Profundidad – m; Peso Total pescado - 0,01g; Sub-muestra - 0,01g)*

Répl. Nº	Horas	Flujómetro	Parámetros medioambientales					PT (g)	Sub-muestra (g)	Observaciones
			TA (°C)	Salinidad	Cond (µS/cm)	TDS (mg/L)	Profundidad (m)			
1	Inicio									
	Fin									
2	Inicio									
	Fin									
3	Inicio									
	Fin									
4	Inicio									
	Fin									
5	Inicio									
	Fin									
6	Inicio									
	Fin									
7	Inicio									
	Fin									
8	Inicio									
	Fin									
9	Inicio									
	Fin									
10	Inicio									
	Fin									
11	Inicio									
	Fin									
12	Inicio									
	Fin									
13	Inicio									
	Fin									
14	Inicio									
	Fin									

## Datos biométricos

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

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 góndadas 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

- Despues 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 translúcidas (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 translúcidas (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 epoxica, 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.](#)

## Datos biométricos

(Longitud Total - mm; Peso Total - g; Peso Eviscerado - g; Sexo - Macho/Hembra/Indeterminado)

### 3. PROTOCOL FOR OTOLITH PREPARATION AND AGE READING

This protocol was developed to harmonize methodologies for otolith preparation and age reading within the framework of SUDOANG. It is based on Manual on Age reading (ICES 2009). The sex of individuals should be identified by macroscopic analysis (See [Protocol to sample gonads for sex ratio assessment](#)).

#### 3.1. Extraction and storage

- Extract both sagittal otoliths from each eel;
- Clean them with water and dry them;
- Store the otoliths dry in small containers (e.g. eppendorfs), but make sure they are fully dry to avoid deterioration.

#### 3.2. Grinding and polishing

- Choose the right otolith for consistency. If not possible choose the left, but include this information in the observations;
- Otoliths can be observed whole (without preparation) with strong transmitted light or on a dark surface with strong incident light. If there are less than 4 to 5 annual marks, the age can be read without any other preparation, except being immersed into 96% ethanol to improve the visualization of the growth marks.
- If age is more than 5 years, otoliths must be embedded in resin;
- Sagittal sections are obtained by embedding directly the otolith in resin while transverse section requires embedding in two layers of resin, so that the otolith is in the middle of the resin block;
- The grinding process must be carefully checked until the midplane of the otolith has been reached. For that, the otolith is examined under a stereo dissecting microscope, with the largest magnification possible, using a variety of light types including transmitted, reflected or polarized light;
- The otolith is ground along the sagittal (if eel is up to 12 years, and otolith is not curved) or transverse plane (requires cutting a slice of otolith along the transverse axis with a diamond saw) (depending on the curvature of the otolith so depending on the size of the otolith) until the centre of the nucleus is reached;
- Grinding can be performed manually, or by using a grinding wheel with silicon carbide sandpaper, lubricated with distilled water;
- Polish the ground surface of the otolith using a decreasing range in coarseness (1200-4000 grit) of silicon carbide wet dry sandpapers, jewellery cloths or pastes made from aluminium or diamond powder, lubricated with distilled water.

For more details on the procedures, consult the Manual for Age Reading of Atlantic eel (link below in the references).

### 3.3. Age reading

- After preparation, you should acquire images of the otoliths to facilitate exchange among all readers.
- Sagittal sections require etching and dying to enhance winter marks. Transverse sections do not require that process;
- Read the age, i.e., count the number of winter marks. Translucent zones (winter) are bright, and opaque zones (summer) are dark, when the otolith is viewed with **transmitted light**. If viewed with **reflected light**, opaque zones (summer) are bright, and translucent zones (winter) are dark.

### 3.4. Material

- Stereo dissecting microscope (with digital camera and image capture and analysis software Image J);
- Glass microscope slides;
- Fine point forceps;
- Mounted needles;
- Slide container box.
- Reagents needed for the preparation:
  - Wax, epoxy resin, to embed the otolith;
  - Alumina and diamond powder pastes for grinding the otolith.

## References

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

## Biometric data

(Total Length - mm; Total Weight - g; Eviscerated Weight - g; Sex - Male/Female/Undifferentiated)

Este protocolo, baseado no Manual de Determinação da Idade (ICES, 2009), foi desenvolvido para harmonizar metodologias de preparação de otólitos e leitura de idades de enguias, no âmbito do projeto SUDOANG. O sexo dos indivíduos deve ser determinado através da análise macroscópica das gónadas (ver *Protocolo de amostragem de gónadas para avaliação do rácio sexual*).

### 3.1. Extração e armazenamento

- Extrair ambos os otólitos *sagittae* de cada enguia;
- Limpar os otólitos com água e, em seguida, secá-los;
- Armazenar os otólitos secos em pequenos recipientes (por ex. *Eppendorfs*), assegurando que estes estão completamente secos para evitar deterioração.

### 3.2. Desbaste e polimento

- Escolher o otólito direito para maior consistência nas leituras. Caso tal não seja possível, deve escolher-se o otólito esquerdo e mencionar esta informação nas observações;
- Os otólitos podem ser observados inteiros (sem preparação) com luz forte transmitida ou sobre uma superfície escura com boa incidência de luz. Se existirem menos de 4 ou 5 marcas, a idade pode ser lida sem qualquer preparação ou, então, após imersão dos otólitos em álcool a 96% para melhor visualização das marcas de crescimento.
- Se a idade for superior a 5 anos, os otólitos devem ser impregnados em resina;
- As secções sagitais são obtidas impregnando o otólito diretamente em resina; no caso de se pretender obter secções transversais, será necessário fazer a impregnação em duas camadas de resina, de modo que o otólito fique posicionado no centro do bloco de resina;
- O processo de desbaste deve ser cuidadosamente controlado até se alcançar o plano médio do otólito. Para tal, o otólito deve ser examinado à lupa binocular, com a maior ampliação possível, e usando diversos tipos de luz, incluindo luz transmitida, refletida ou polarizada;
- O otólito deve ser desbastado ao longo do plano sagital (se a enguia tiver até 12 anos e o otólito não for curvo) ou no plano transversal (requer cortar uma fatia do otólito ao longo do eixo transversal usando uma serra de diamante) (dependendo da curvatura do otólito e dependendo do tamanho do otólito) até alcançar o centro do núcleo;
- O processo de desbaste pode ser feito manualmente ou usando uma roda de desbaste com lixa de sílica, lubrificada com água destilada;
- Deve polir-se a superfície desbastada do otólito usando lixa de carboneto de silício uma gama decrescente de dureza (grão entre 1200-4000), panos de joalharia ou pastas à base de alumínio ou pó de diamante, lubrificado com água destilada.

Para mais informações sobre os procedimentos, ver Manual de Determinação da Idade da enguia atlântica (ver link que aparece depois das referências).

### 3.3. Determinação da idade

- Após preparação dos otólitos, devem obter-se imagens dos mesmos para partilhar entre os vários leitores;
- As secções sagitais requerem desbaste e coloração para realçar as marcas de inverno. As secções transversais não requerem este procedimento;
- Deve proceder-se à leitura da idade, isto é, à contagem do número de marcas de inverno. As zonas translúcidas (inverno) são claras, e as zonas opacas (verão) são escuras, quando o otólito é observado com **luz transmitida**. Ao utilizar **luz refletida**, as zonas opacas (verão) são claras, e as zonas translúcidas (inverno) são escuras.

### 3.4. Material

- Lupa binocular (com câmara digital e captura de imagens e software de análise Image J);
- Lâminas de vidro para microscópio;
- Pinças de ponta fina;
- Agulhas de dissecção;
- Recipiente de lâminas;
- Reagentes necessários para a preparação:
  - Cera, resina epoxy, para impregnação do otólito;
  - Pasta de alumina e pasta de diamante para desbastar otólitos.

### Referências

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

### Dados biométricos

(Comprimento Total - mm; Peso Total - g; Peso Eviscerado - g; Sexo - Macho/Fêmea/Indiferenciado)

### 3. PROTOCOLE DE PRÉPARATION DE L'OTOLITHE ET LECTURE DE L'ÂGE

Ce protocole a été conçu pour harmoniser les méthodes de préparation de l'otolithe et de la lecture de l'âge dans le cadre de SUDOANG. Il est basé sur le manuel de lecture de l'âge (ICES 2009). Le sexe des individus doit être identifié par analyse macroscopique (Voir Protocole d'échantillonnage des gonades en vue d'évaluer le sex ratio).

#### 3.1. Extraction et stockage

- Extrayez les deux otolithes *sagittae* de chaque anguille ;
- Lavez-les à l'eau et séchez-les ;
- Stockez les otolithes à sec dans de petits récipients (par ex. eppendorfs) mais assurez-vous qu'ils sont bien secs pour éviter toute détérioration.

#### 3.2. Ponçage et polissage

- Choisissez l'otolithe droite pour une meilleure cohérence. Si cela n'est pas possible, prenez la gauche, mais indiquez cette information dans les observations ;
- Les otolithes peuvent être observées entières (sans préparation) sous une lumière forte ou sur une surface foncée avec une lumière forte incidente. S'il y a moins de 4 ou 5 marques annuelles, l'âge peut-être lu sans aucune autre préparation, ou après immersion des otolithes dans l'alcool à 96% pour une meilleure visualisation des marques de croissance;
- Si l'âge est supérieur à 5 ans, les otolithes doivent être incrustées dans la résine ;
- Les sections sagittales sont obtenues en incrustant directement l'otolithe dans la résine ; la section transversale doit être incrustée dans deux couches de résine pour que l'otolithe soit placé au milieu du bloc de résine ;
- L'opération de ponçage doit être réalisée avec soin jusqu'au milieu de l'otolithe pour ce faire être examinée sous un microscope de dissection stéréo au plus gros grossissement possible et sous plusieurs types d'éclairage ; transmis, réfléchis ou polarisé ;
- L'otolithe est disposé le long du sagittale (si l'anguille est âgée de 12 ans maximum et l'otolithe n'est pas courbe) ou sur le plan transversal (pour ce faire, découpez un morceau d'otolithe le long de l'axe transversal à l'aide d'une scie diamantée) (en fonction de la courbure de l'otolithe, en fonction donc de la taille de l'otolithe) jusqu'au centre du noyau ;
- Le ponçage peut se faire à la main ou à l'aide d'une meule en carbure de silicium avec un papier de ponçage sec ;
- Polissez la surface arrondie de l'otolithe avec des papiers de ponçage au carbure de silicium de différentes duretés (grain de 1200-4000), papier de bijoutier ou des pâtes à base d'aluminium ou de poudre de diamant.

Pour plus de détails concernant les procédures, veuillez consulter le **Manuel de lecture de l'âge de l'anguille de l'Atlantique** (voir les références ci-après).

### 3.3. Lecture de l'âge

- Après préparation, veuillez prendre des photos des otolithes pour faciliter les échanges d'information entre tous les lecteurs.
- Les sections sagittales doivent être gravées et teintes pour souligner les marques de croissance saisonnières. Cette opération n'est pas nécessaire pour les sections transversales ;
- Lisez l'âge, c'est-à-dire, comptez le nombre de stries saisonnières. Les zones translucides (hiver) sont claires et les zones opaques (été) sont foncées, lorsque l'otolithe est observé avec la **lumière transmise**. Si elles sont observées sous de la **lumière réfléchie**, les zones opaques (été) sont claires, et les zones translucides (hiver) sont foncées.

### 3.4. Matériel

- Microscope stéréo de dissection (avec caméra numérique et capture d'image et logiciel d'analyse Image J) ;
- Lames de microscope en verre ;
- Pinces à pointes fines ;
- Aiguilles montées ;
- Récipient de lamelles.
- Réactifs nécessaires pour la préparation :
  - Cire, résine époxy, pour incruster l'otolithe ;
  - Pâtes de poudre d'alumine et de diamant pour poncer l'otolithe.

### Références

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

## Données biométriques

(Longueur Totale) - mm ; Poids Total - g ; Poids Éviscétré) - g; Sexe - Mâle/Femelle/ Indifférencié)