

JACUMAR
JUNTA NACIONAL ASESORA DE CULTIVOS MARINOS

PLANES NACIONALES DE CULTIVOS MARINOS

INFORME FINAL (avance)

Título: Análisis y estudio de factores de cultivo que condicionan la producción industrial del lenguado senegalés (*Solea senegalensis*)

RESUMEN EJECUTIVO (MÁXIMO 10 PÁGINAS)

1.- DATOS ADMINISTRATIVOS

TÍTULO: Análisis y estudio de factores de cultivo que condicionan la producción industrial del lenguado senegalés (*Solea senegalensis*)

FECHAS DE REALIZACIÓN: 2006 a 2008

DATOS DEL COORDINADOR DEL PROYECTO

Nombre y Apellidos: José Pedro Cañavate Hors
Organismo: Instituto de Investigación y Formación Agraria, Pesquera y de la Producción Ecológica. Junta de Andalucía.
Centro: IFAPA Centro El Toruño
Correo electrónico: josep.canavate@juntadeandalucia.es

Comunidades Autónomas participantes

Andalucía, Cantabria, Cataluña, Galicia, Valencia

2.- RESULTADOS TECNICOS DEL PLAN NACIONAL

2.1. OBJETIVOS

A) Aumentar el nivel de reproducción en cautividad del lenguado.

A1.Diferenciar posibles alteraciones en las pautas de cortejo sexual, así como discriminar posibles patrones de jerarquización y/o dominancia en reproductores de lenguado

A.2.Comprobar efectos de la alimentación en la cuantía y calidad de la puesta.

A.3.Caracterizar genéticamente reproductores, y conocer el grado de contribución paterna a la progenie en tanques de reproducción.

A.4.Determinar diferencias en la calidad del esperma y ovocitos de lenguado, en función del origen de los mismos y las condiciones de cultivo.

A.5.Desarrollar y aplicar tratamientos hormonales para la estimulación de la espermiación, ovulación y puesta en el lenguado.

A.6.Utilizar ciclos de luz y temperatura artificiales para la inducción, sincronización y desplazamiento de la época de puesta del lenguado.

B) Conocer mejores condiciones zoonosanitarias para el engorde del lenguado y reducir el grado de afectación por infecciones bacterianas.

B.1. Caracterizar estirpes bacterianas en lenguados sanos y enfermos registradas en diferentes centros de investigación.

B.2. Comprobar el papel de la bacteria en la enfermedad y contar con herramientas para probar mecanismos de control o prevención.

B.3. Encontrar factores que contribuyen a desencadenar enfermedades en los lenguados.

B.4. Conocer cambios en la actividad de enzimas metabólicas del lenguado, en respuesta a diferentes condiciones de cultivo.

B.5. Valorar el efecto protector y/o inmunoestimulante en el lenguado de microorganismos probióticos.

2.3. METODOLOGÍA (muy resumida)

Los trabajos relacionados con la reproducción del lenguado estuvieron basados en la captura, aclimatación y mantenimiento de ejemplares en tanques de cultivo. A partir de estas estructuras se implementaron diversas actuaciones específicas, de acuerdo a las necesidades experimentales. Así, se consiguió elaborar un sistema para la observación del comportamiento del lenguado, en el que se dispusieron cámaras con un ángulo de campo de visión de 150° para contrarrestar el efecto de refracción del agua y filmación blanco y negro, con la capacidad de filmar en condiciones de luz de 0.003 lux o luz infrarrojo.

El sistema para la maduración sexual y la obtención de puestas naturales en el lenguado ha consistido en la aplicación de las fluctuaciones en la temperatura del agua de mar, bien de manera natural o bien manipulada por tratamiento térmico. Para los experimentos sobre el efecto del fotoperíodo en reproductores, la manipulación de este factor se inició a partir del solsticio de invierno (21 diciembre) y se mantuvo durante un año.

Para los ensayos de paternidad, se tomaron muestras de sangre de los reproductores y se extrajo el ADN para la determinación de microsatélites. Los tratamientos hormonales empleados fueron aquellos que previamente habían demostrado su eficacia en la estimulación a la puesta (implantes de GnRH α) y a la espermiación (implantes de GnRH α o inyecciones semanales de hCG). Los análisis hormonales se efectuaron mediante inmunoensayos específicos ELISA, sobre muestras sanguíneas obtenidas de reproductores de lenguado. Se han puesto a punto y validado 4 inmunoensayos ELISA específicos para el lenguado, para el análisis de vitelogenina (VTG) y de tres esteroides sexuales, estradiol (E2), testosterona (T) y 11-ketotestosterona (11KT).

Dentro de los trabajos del área de sanidad, los diferentes aislados microbianos fueron caracterizados con pruebas bioquímicas, moleculares y se caracterizó su perfil de antibioresistencia a 18 antibióticos. Cuando no se identificó la especie bacteriana, se secuenció el ADN del gen 16S ribosomal. Inicialmente, se normalizó un método de infección por inyección. Para ello se llevó a cabo un experimento preliminar (*"range finding test"*). Se emplearon cepas de *Photobacterium damsela* subsp. *damsela* aisladas a partir de brotes anteriores.

Para establecer la concentración y volúmenes óptimos en los experimentos de cohabitación se efectuaron inyecciones intramusculares.

Los experimentos de densidad de estabulación se realizaron con juveniles de *S. senegalensis* (de 70 a 100 g), en tanques de fibra de 0,5 m². Como método indirecto de cálculo del gasto metabólico, se determinó la tasa de consumo de oxígeno. Para la caracterización individual de las tasas de crecimiento, se utilizaron marcas visibles de elastómeros, implantadas en los lados ciegos de los lenguados. Los análisis de expresión génica se realizaron en hígado y riñón. Estas muestras fueron homogenizadas y se aisló su ARN total. Para el estudio de la hipersaturación de oxígeno en agua se llevaron a cabo una serie de análisis proteómicos, con los siguientes pasos: 1. Preparación de las fracciones citosólicas y ensayo de proteínas. 2. Análisis de electroforesis en dos dimensiones (2-DE). 3. Digestión en gel y análisis mediante espectrofotometría de masas (MS). 4. Identificación de proteínas

En el estudio de la respuesta fisiológica frente a estrés oxidativo, los lenguados fueron inducidos con sulfato de cobre (2 mg/Kg) y Paraquat (10 mg/Kg), evaluándose el efecto de la alimentación con dietas naturales, y con dietas inertes suplementadas con vitaminas E y C. En el estudio de la temperatura como factor de estrés se utilizaron juveniles de lenguado, adaptados en cultivo durante 45-60 días a 20°C. Estos peces fueron sometidos a cambios agudos (1 día) ó crónicos (7 días) de temperatura del agua, que se aumentó 5°C hasta alcanzar 25°C ó se enfrió hasta 15°C. El efecto de la temperatura se estudió con dos tipos de dietas: una basada en presa viva (poliquetos) y una dieta comercial. Se ensayaron 10 enzimas, cuatro antioxidativas primarias que eliminan especies reactivas de O₂ (EROs) y cinco antioxidativas auxiliares que regeneran el poder reductor gastado por las EROs. Se han medido también las concentraciones de AMP, ADP, ATP que permiten calcular la carga energética adenílica (AEC), un parámetro clave del bienestar fisiológico. Además de biomarcadores bioquímicos, se hizo una aproximación proteómica integral por electroforesis bidimensional acoplada a la secuenciación *de novo* para identificar proteínas con expresión diferencial que respondan frente a estrés oxidativo.

Los experimentos con probióticos se realizaron con larvas y juveniles de lenguado. Los probióticos se cultivaron en placas de TSA salino a 22°C. Su efecto protector y/o inmunoestimulante fue valorado al término de las experiencias mediante infección experimental con *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* y *Vibrio harveyi* (i.p. ó en baño) y/o mediante la determinación de parámetros inmunológicos: actividades antiproteasa y medida de anticuerpos específicos.

2.4. RESULTADOS

Resultados correspondientes al objetivo A) Aumentar el nivel de reproducción en cautividad del lenguado.

Para la correcta visualización y video filmación de reproductores de lenguado se requiere una fuente de iluminación que puede ser a partir de luz

infrarroja. Los patrones de actividad registrados por los sensores infrarrojos en el fondo de los tanques fueron similares independientemente del tratamiento de luz nocturna. A destacar el hecho de que el nivel de melatonina en los lenguados a media noche (24:00) es afectado con una intensidad de 50 lux.

El comportamiento reproductivo se ha estructurado en cuatro pasos (0 a 3). En el paso 0, se describen interacciones entre machos y hembras, pero no se vislumbra la formación de parejas. En el paso 1, parece que un pez o grupo de peces han centrado su atención en otro pez o grupo de peces. Los machos se vuelven más insistentes en los contactos con las hembras (aproximaciones). El paso 2 se consigue cuando la hembra acepta al macho (interacción permitida), comienza a nadar más separada del suelo (natación a la superficie), el macho se introduce bajo la hembra y comienza a elevarse, subiendo con la hembra hasta la superficie y controlando su avance con la cabeza. En el paso 3 la hembra y el macho llegan juntos a la superficie y tras unos segundos en esta situación, la hembra y el macho comienzan a liberar los gametos. Este paso 3 ha sido observado en las 8 puestas recogidas.

En los tanques sujetos a estudio de comportamiento, cantidades superiores a 20 mL de huevos fueron recolectados un total de 31 veces, indicando que una o las dos hembras habían desovado durante la noche anterior. Durante 462 horas analizadas, no se observó comportamiento de cortejo. En dos noches que se registraron puestas, el análisis de los videos confirmó que no hubo comportamiento reproductivo asociado con la liberación de los huevos, tanto en reproductores tratados con HCG como en peces no tratados hormonalmente. La actividad de los reproductores, medida como el número de veces que los peces cambiaron de posición durante un período de 30 minutos, fue significativamente superior en los grupos en que los machos fueron tratados con GnRHa y hCG. Sin embargo, no hubo diferencia en la actividad entre los sexos y no hubo interacción (tratamiento vs sexo) que indicase que el tratamiento con hormona de los machos aumenta la actividad tanto de machos como de hembras.

Como resultado de la experimentación llevada a cabo durante estos tres años, se ha producido un total de 40,4 millones de larvas de lenguado. Esta producción se reparte de manera que 15,3 millones corresponde a Cantabria, 19,4 a Andalucía y 5,7 a Galicia. En el stock mantenido en Cádiz se observó un descenso en la producción a lo largo de estos años, situación que podría estar relacionada con cierto envejecimiento de este stock. Por el contrario, en los reproductores de Santander se observa un incremento que podría estar relacionado, bien con una mejor adaptación a la cautividad de los ejemplares, o bien como resultado de la reestructuración del stock acometida en el 2007, atendiendo a los resultados de los análisis genéticos realizados. Por otro lado, hay cinco centros que mantienen reproductores de primera generación (F1) de lenguado cultivado: El Toruño IFAPA (Cádiz, C.A. Andalucía), el IEO (Santander, C.A. Cantabria) y IEO (Vigo, C.A. Galicia), IATS (Castellón, C.A. Valencia) y IRTA (Tarragona, C.A. Cataluña). Las puestas recogidas a partir de reproductores F1 no fueron fecundadas, a excepción de algunas obtenidas en el Toruño, donde se ha registrado fecundación y eclosión similares a las de ejemplares salvajes.

La producción total de huevos ha sido mayor en los lenguados alimentados con dieta natural frente a los que recibieron pienso. Además, los lenguados cultivados con alimento natural presentaron un mayor crecimiento, mientras que los alimentados con pienso mostraron un mayor factor de condición. Los valores de lípidos totales en varios tejidos fueron más altos en los peces cultivados tanto en hembras como en machos. Las diferencias más significativas se observaron para el hígado. En hembras de cultivo el hígado mostró un 56% de lípidos, mientras que en peces salvajes este valor fue del 17%.

Para los ácidos grasos poliinsaturados (PUFA) y los altamente insaturados (HUFA) se observó un incremento en la concentración en peces F-1. El ácido eicosapentaenoico (EPA) aumentó en hembras cultivadas. En el caso del ácido araquidónico (ARA), los machos F-1 mostraron una reducción altamente significativa con respecto a los machos salvajes, calculándose una reducción del orden del 215%. En el caso de las hembras F-1, comparadas con las salvajes, esta reducción fue menor pero igualmente significativa, del orden del 57%. La proporción EPA/ARA presentó diferencias altamente significativas entre los grupos salvajes y F-1, especialmente en hígado y músculo, observándose valores altos en el caso de los peces cultivados y comparativamente más bajos en el grupo de peces salvajes. En la proporción DHA/ARA los valores en peces cultivados mostraron tendencias más altas que en los salvajes. Estas tendencias se ven más pronunciadas en el caso de los machos.

La caracterización genética de lotes diferenciados de reproductores revela que los valores de variabilidad más altos corresponden a subpoblaciones de origen salvaje. El estudio de los valores de diferenciación genética entre las subpoblaciones revela que los grupos de origen cultivado representan muestras de la misma población. Esto es especialmente relevante en algunos casos donde la mayoría de los individuos son hermanos y medios hermanos. Las similitudes genéticas entre estos dos grupos revelan que estos individuos proceden del cruce entre unos pocos reproductores.

Los resultados de caracterización del esperma de lenguado indican un volumen medio de semen bajo ($83,81 \pm 15,91 \mu\text{L}$), con una densidad media de $1,12 \pm 0,19 \times 10^9$ espermatozoides por mL y una movilidad alta. Entre un 60-80% de espermatozoides móviles con una duración de la movilidad entre 50-60 segundos. Además, el esperma guardado a 4 °C mostraba una pérdida de la movilidad tras 24 horas; pero el esperma diluido en la solución salina de Ringer 200 mOsmol mejoraba significativamente su movilidad. Respecto al tratamiento hormonal, a las 48 horas con una dosis de $10 \mu\text{g kg}^{-1}$ se encontró un volumen mayor de esperma que con $5 \mu\text{g kg}^{-1}$, pero la densidad del esperma decrecía después de 96 y 144 horas del tratamiento.

El volumen, densidad y producción del esperma fueron superiores durante el periodo principal de puesta (primavera). El volumen de esperma aumentó de $35,65 \mu\text{l}$ en Febrero a $130,83 \mu\text{l}$ en Marzo, para luego decrecer. La mayor producción de esperma se obtuvo en Junio. La mayor movilidad del esperma ($3,38 \pm 0,47$) se encontró en Marzo, coincidiendo con la menor densidad del

esperma ($0,75 \pm 0,14 \times 10^9$ espermatozoides por ml). Se comprobó que el esperma de los lenguados criados en cautividad (F1) tienen la capacidad de fecundar huevos, con un 42% de los machos con más de un 80% de movilidad de espermatozoides. Sin embargo, no se puede descartar que alguna disfunción reproductiva afecte la producción de esperma o impida a los machos con esperma de buena calidad, participar en el cortejo y fecundación de los huevos. La calidad del esperma durante todo el periodo de puesta para dos grupos de reproductores F1, estuvo positivamente influenciada por el uso de una dieta natural.

El tratamiento hormonal con implantes de GnRHa de hembras en estado de maduración avanzado E3 permitió obtener huevos a las 48h mediante masaje abdominal, tanto en hembras salvajes como en F1. Estos huevos pudieron ser fecundados con esperma, también obtenido por masaje abdominal de machos salvajes y F1. Los resultados indican que los gametos de la generación F1 son viables, no observándose diferencias entre las fecundaciones de huevos procedentes de hembras salvajes y cultivadas. Ambos tipos de huevos son igualmente viables para llevar a cabo la fecundación artificial. Se observaron también valores similares para la fecundación al usar esperma criopreservado, indicando que el protocolo de criopreservación era apropiado para guardar el esperma de lenguado senegalés.

Los tratamientos hormonales utilizados producen gametos aptos para la fecundación. Sin embargo, dichos tratamientos no se reflejaron en la consecución de puestas espontáneas en los tanques de reproductores. Es posible que el tratamiento de los machos afecte a la fecundidad de las hembras, ya que este parámetro llegó a duplicarse en hembras que compartieron tanque con machos tratados con hCG. Este incremento de fecundidad hembras cohabitando con machos tratados hormonalmente indicaría una “comunicación” entre los individuos de distinto sexo de la población, probablemente a través de feromonas; en esta experimentación, el sistema de comunicación feromonal estaría estimulado por los tratamientos aplicados a los machos. El tratamiento con fármacos anti-dopaminérgicos (pimozide) estimuló ligeramente la maduración ovárica y podría potenciar el efecto estimulador del tratamiento con GnRHa. Sin embargo, la aplicación de este tipo de fármaco bloqueante de la acción de la dopamina (neurotransmisor inhibidor de la maduración gonadal) en machos y hembras de lenguado no tuvo efectos positivos sobre la obtención de puestas fecundadas en reproductores F1 y no mejoraría por tanto la eficacia de las terapias GnRHa.

En lo relativo a la inducción de puesta mediante factores ambientales, se observó que en todos los tanques, tanto los sometidos a fotoperíodo constante como los mantenidos en fotoperíodo natural, se registraron puestas espontáneas. No se observaron diferencias en las características de puesta de 4 tanques experimentales, en términos de inicio y fin del periodo de puestas, nº de puestas y fecundidad de las hembras. La flotabilidad de las puestas fue baja, aunque similares a lo observado previamente en reproductores F1. La tasa de fertilización fue nula, como se detecta habitualmente en los lotes de reproductores F1.

Resultados correspondientes al objetivo B) Conocer mejores condiciones zoonosanitarias para el engorde del lenguado y reducir el grado de afectación por infecciones bacterianas.

A partir de aislados bacterianos en lenguados sanos y enfermos se han identificado nueve géneros, *Pseudoalteromonas* (1 especie), *Shewanella* (4), *Vibrio* (24), *Photobacterium* (1), *Salinivibrio* (1), *Psychrobacter* (3), *Marinomonas* (1), *Staphylococcus* (1) y *Acinetobacter* (1). La única especie encontrada en un organismo enfermo fue *V. fortis*. El resto de las especies encontradas se localizaron tanto en peces sanos como en enfermos.

En los experimentos de cohabitación, densidades bacterianas de 10^4 y 10^5 ufc mL⁻¹ parecen ser las más apropiadas, proporcionando el periodo de tiempo más largo entre en la aparición de la infección y el momento de la muerte. Para las dosis más altas, los peces inyectados murieron los dos primeros días después de la inyección, mientras que a bajas concentraciones los peces inyectados no desarrollaron los signos de Vibriosis.

Los lenguados cultivados bajo densidades iniciales de 2, 7, 15 y 30 kg m⁻² no mostraron diferencias significativas en crecimiento. Aunque el incremento de las condiciones de carga favoreció una mayor ingestión de pienso, el contenido digestivo relativo resultó independiente respecto del tamaño del propio animal para todas las densidades de cultivo. De este modo, se determinó un efecto nulo de la condición de carga sobre el establecimiento de jerarquías basadas en tamaño, en lo que al comportamiento alimenticio se refiere. El consumo de oxígeno en ausencia de actividad alimenticia no mostró diferencias significativas. Sin embargo, una vez la actividad alimenticia era iniciada sí se observó un mayor consumo de oxígeno para las condiciones de mayor actividad alimenticia, que se correspondieron con la mayor densidad de estabulación.

El crecimiento de las tres subpoblaciones creadas a partir de individuos que habían mostrado previamente un crecimiento alto ($1,04 \pm 0,31\%$ d⁻¹), medio ($0,66 \pm 0,10\%$ d⁻¹) y bajo ($0,18 \pm 0,12\%$ d⁻¹) fue similar. Las tres subpoblaciones tendieron a mostrar unos mismos valores de SGR (aprox. $0,6\%$ d⁻¹) y FCR en todos los puntos de muestreo, independientemente de sus crecimientos previos. La comparación de estos entre las poblaciones de lenguado clasificadas y sin clasificar reveló un crecimiento superior en poblaciones sin clasificar.

Los niveles totales de ARNm correspondientes a IGF-I disminuyeron significativamente en hígados de individuos cultivados a 30 kg m⁻². En riñón, no se observó ningún cambio significativo entre densidades o regímenes alimenticios respecto a los niveles de transcritos de IGF. Los niveles de ARNm correspondientes a HSP70 disminuyeron significativamente para la densidad más alta tanto en hígado como en riñón. No se observaron diferencias asociadas al régimen alimenticio. Los transcritos de lisozima tipo-g disminuyeron significativamente en individuos cultivados a alta densidad. Además, los niveles de ARNm correspondientes a la lisozima tipo-g también se redujeron con la ración alimenticia más baja tanto en hígado como en riñón. Los niveles de

transcritos de HAMP1 disminuyeron significativamente en hígados de animales cultivados a 30 kg m⁻² (~5 veces).

Una exoftalmia crónica fue el primer y más característico síntoma observado en lenguados afectados por hiperoxia. En su estado agudo, las burbujas comprimidas en las zonas próximas a los tejidos llevó a la degeneración de estos y a la aparición de cataratas. El segundo síntoma visible para la detección precoz de brotes de GBD es la aparición de burbujas bajo la piel. En branquias, 205 manchas citosólicas se expresaron de manera diferencial según el estado de salud. De estas, 25 fueron seleccionadas para su posible identificación mediante análisis de espectrofotometría de masas (MS). De las 1632 proteínas hepáticas solubles obtenidas de *S. senegalensis*, 498 se expresaron de modo diferencial según el estado de salud. De estas 498 manchas diferencialmente expresadas, 23 fueron seleccionadas para una posible identificación por MS. La mayoría de las proteínas identificadas en branquias (50 %) son constituyentes del citoesqueleto o están implicadas en la motilidad (β -ACT, β -TBB, α -TPM, MLC1). Otras tres (37,5 %) tienen papeles regulatorios (CaM; RKIP, dos manchas), mientras que una (12,5 %) está implicada en la generación de energía a partir de carbohidratos (Gliceraldehido 3-P deshidrogenasa (GAPDH)). En hígado, además de la HBB, implicada en el transporte de oxígeno, otras proteínas relacionadas con el transporte de lípidos (FABP), metabolismo de carbohidratos (DCXR) y aminoácidos (GNMT), y sistema del complemento (C3) fueron identificadas.

De las 10 enzimas hepáticas relacionadas con la protección frente al estrés oxidativo, sólo 5 mostraron respuesta frente al CuSO₄ y al PQ. Las dos vitaminas protegieron frente a los efectos del PQ. En el caso del CuSO₄, fue la vitamina E la más efectiva. El suplemento del alimento con vitamina E, fue el que más protegió frente a los efectos del CuSO₄. Se visualizaron un total de 2.926 proteínas en los geles estudiados (pH 4-7, PM 6,5-250 kDa), de las que 22 tenían un patrón específico de expresión proteica (PES) para el CuSO₄. Las 7 manchas de proteínas que se han identificado son una mancha de proteína SH3BGRL, otra (SSP 5529) como FABP7 y, finalmente, 5 manchas de proteína (SPP 2207, 3231, 3306, 6113 y 7327) componentes C3 del sistema del complemento.

En lenguados alimentados con presa viva se observa un incremento en la proteína hepática cuando la temperatura se incrementa 5°C (hasta 25°C) de forma aguda, mientras que la GOR se induce cuando la exposición a esta temperatura es crónica. Los resultados más claros se observan, sin embargo, en lenguados alimentados con pienso. Se producen claros síntomas de estrés oxidativo cuando los animales se exponen a incrementos de 5°C de la temperatura del agua (agudo y crónico), con aumentos de las tres actividades enzimáticas (G6PDH, 6PGDH, GOR) y de la proteína hepática. No se observó ningún cambio con ninguna de las dos dietas cuando la temperatura del agua se bajó 5°C hasta los 15°C.

Dado que algunas enzimas metabólicas clave aumentaron con la densidad de estabulación de los lenguados, se determinó carga energética adenílica (AEC), observándose como al inicio del experimento los peces tenían gran demanda energética, con AEC muy baja (0,32). Al pasar a distintas densidades la AEC

empeoró, aunque a $11,5 \text{ Kg m}^{-2}$, la AEC fue cercana a la inicial, subiendo incluso al final. La menor carga energética se obtuvo a $1,15 \text{ Kg m}^{-2}$. Los lenguados mantenidos a $\sim 30 \text{ Kg m}^{-2}$ presentaron una AEC menor ($\sim 0,27$) que a $11,5 \text{ Kg m}^{-2}$, coincidiendo con niveles de MDA superiores en peces mantenidos a $\sim 30 \text{ Kg m}^{-2}$.

La adición de probióticos de forma continua entre los días 7 y 88 de cultivo aumentó el crecimiento en un 38% a partir del destete, obteniendo también menor dispersión para el peso. El probiótico añadido desde el cultivo larvario y durante el preengorde, produce una mayor supervivencia y protege frente a infección experimental con *Photobacterium* sp. al cabo de diez meses, no afectando a los parámetros inmunológicos estudiados.

2.5. CONCLUSIONES/APLICABILIDAD DE LOS RESULTADOS DEL PLAN

Una primera conclusión general, que engloba varios de los objetivos iniciales de este proyecto, es la tremenda importancia encontrada para varios parámetros productivos (fecundidad, calidad del esperma, capacidad de defensa frente a patógenos o cambios bruscos en la temperatura del agua) cuando los lenguados son alimentados con dieta fresca natural, en comparación con la alimentación a base de piensos compuestos.

De alta relevancia para el sector productor es también el hecho de haber comprobado como los reproductores de origen cultivado (F1) poseen gametos que son aptos para la fecundación artificial. Las técnicas de inducción hormonal utilizadas para facilitar la obtención manual de gametos son sencillas y de aplicabilidad directa para cualquier criadero, además de abrir las puertas a la selección genética. Por otro lado, la facilidad para la criopreservación del esperma de lenguado contribuye a la viabilidad de esta técnica.

Los estudios, apoyados en observaciones del comportamiento reproductor, sugieren la existencia de algún tipo de disfunción en los mecanismos de comunicación sexual para ejemplares F1 en el aparentemente complejo proceso de cortejo sexual que experimenta esta especie.

La viabilidad del procedimiento de manipulación térmica en diferentes instalaciones del país, avala la aplicabilidad de este proceso sencillo para la obtención de puestas en cualquier lugar que se dote con un equipamiento sencillo para el control de la temperatura del agua y utilice ejemplares salvajes adecuadamente aclimatados.

El hecho de que el crecimiento del lenguado no se vea afectado por densidades elevadas de cultivo indica que este factor directamente no afecta a la rentabilidad de su explotación. Son factores indirectos, como un eventual estado de inmutación motivado por la elevada carga de animales, los que predisponen al lenguado a padecer enfermedades.

Se ha demostrado como la clasificación de grupos de lenguados cultivados según su tamaño o su crecimiento previo no mejora los parámetros de producción

respecto de los mostrados cuando las poblaciones de lenguado no se clasifican. La heterogeneidad de tamaño del grupo mejora el crecimiento poblacional, debido a una ordenación social más eficiente, y esto conlleva importantes implicaciones de cara a mejorar las tareas que deben ejecutarse en los centros de producción.

La disponibilidad de varios biomarcadores de estrés oxidativo puede ser de gran ayuda en la prevención de estados alejados del bienestar animal que debe imperar en una explotación de lenguados, como un elemento más en la prevención de enfermedades. Por otro lado, diferentes probióticos pueden igualmente contribuir a esta situación de optimización del bienestar animal.

2.6. VALORACIÓN

Los resultados y conclusiones presentados en este informe confirman sobradamente las hipótesis de trabajo planteadas en su momento, observándose una notable evolución en las prioridades de investigación y desarrollo tecnológico que el lenguado presenta de cara a su plena puesta en cultivo a nivel industrial. A lo largo de varios años de trabajo, se ha observado como el problema principal que condiciona la producción se iba trasladando de una etapa a otra de su ciclo de vida. En la actualidad, los problemas de mortalidad por enfermedad durante el engorde, acaparan la prioridad.

Una prueba del potencial de producción de juveniles de lenguado en España, resulta de los más de 40 millones de larvas que se han producido solo como consecuencia de la experimentación en este Plan Nacional. Con las técnicas de alevinaje ya conocidas, que permiten supervivencias muy elevadas, y conociendo el tamaño comercial de esta especie, resultaría fácil estimar en unas 15,000 Tm la capacidad anual de producción nacional de lenguado cultivado. Sin embargo, la cifra real se sitúa en torno a dos órdenes de magnitud por debajo. En este proyecto, además de contribuir con información de utilidad para optimizar el cultivo del lenguado, se han sentado unas bases sobre las que continuar investigando para poder conseguir controlar el ciclo biológico del lenguado completamente en cautividad.

2.7. DIFUSIÓN

En el momento de la elaboración de este informe, los resultados de este Plan Nacional han sido difundidos de la siguiente manera:

Comunicaciones a Congreso: 30

Publicados en revistas científicas evaluadas internacionalmente: 4

Publicaciones Técnicas: 1

2.8. INCIDENCIAS DE DESARROLLO

INFORME FINAL EXTENSO

1.- DATOS ADMINISTRATIVOS

TÍTULO: Análisis y estudio de factores de cultivo que condicionan la producción industrial del lenguado senegalés (*Solea senegalensis*)

FECHAS DE REALIZACIÓN

Inicio: Enero 2006

Finalización: Diciembre 2008

DATOS DEL COORDINADOR DEL PROYECTO

Nombre y Apellidos: José Pedro Cañavate Hors

Organismo: Instituto de Investigación y Formación Agraria, Pesquera y de la Producción Ecológica. Junta de Andalucía.

Centro: IFAPA Centro El Toruño

Correo electrónico: josep.canavate@juntadeandalucia.es

Departamento:

Teléfono: 956011312

Fax: 956011324

Dirección postal completa: IFAPA Centro El Toruño, Apartado 16, 11500 Puerto de Santa María, Cádiz

PARTICIPANTES por cada Comunidad Autónoma

CENTROS DE INVESTIGACIÓN

1) ANDALUCIA

Tipo de centro: Centro Público I+D

Nombre: Instituto de Investigación y Formación Agraria, Pesquera y de la Producción Ecológica. Junta de Andalucía.

CIF: Q-4100689-A

Nombre Representante Legal: Francisco Javier de las Nieves

DATOS DE LOS INVESTIGADORES EN ANDALUCÍA

Apellidos: Anguis Climent
Nombre: Victoria
Organismo: Instituto de Investigación y Formación Agraria, Pesquera y de la Producción Ecológica. Junta de Andalucía.
Centro: IFAPA Centro El Toruño
Teléfono: 956011308
Fax: 956011324
Correo electrónico: mariav.anguis@juntadeandalucia.es
Dirección Postal: Apartado 16. 11500 El Puerto de Santa María. Cádiz.

Apellidos: Cañavate Hors
Nombre: José Pedro
Organismo: Instituto de Investigación y Formación Agraria, Pesquera y de la Producción Ecológica. Junta de Andalucía.
Centro: IFAPA Centro El Toruño
Teléfono: 956011312
Fax: 956011324
Correo electrónico: josep.canavate@juntadeandalucia.es
Dirección Postal: Apartado 16. 11500 El Puerto de Santa María. Cádiz.

Apellidos: Manchado Campaña
Nombre: Manuel
Organismo: Instituto de Investigación y Formación Agraria, Pesquera y de la Producción Ecológica. Junta de Andalucía.
Centro: IFAPA Centro El Toruño
Teléfono: 956011315
Fax: 956011324
Correo electrónico: manuel.manchado@juntadeandalucia.es
Dirección Postal: Apartado 16. 11500 El Puerto de Santa María. Cádiz.

Apellidos: Salas Leiton
Nombre: Emilio
Organismo: Instituto de Investigación y Formación Agraria, Pesquera y de la Producción Ecológica. Junta de Andalucía.
Centro: IFAPA Centro El Toruño
Teléfono: 956011337
Fax: 956011324
Correo electrónico: emilio.salas@juntadeandalucia.es
Dirección Postal: Apartado 16. 11500 El Puerto de Santa María. Cádiz.

Apellidos: López Barea
Nombre: Juan
Organismo: Universidad de Córdoba.
Centro: Departamento de Bioquímica y Biología Molecular.
Teléfono: 957218687

Fax: 957218688
Correo electrónico: bb1lobaj@uco.es
Dirección Postal: Edificio Severo Ochoa, planta 2ª. Campus de Rabanales
Universidad de Córdoba. 14012-Córdoba

Apellidos: Alhama
Nombre: José
Organismo: Universidad de Córdoba.
Centro: Departamento de Bioquímica y Biología Molecular.
Teléfono: 957218687
Fax: 957218688
Correo electrónico: bb2alcaj@uco.es
Dirección Postal: Edificio Severo Ochoa, planta 2ª. Campus de Rabanales
Universidad de Córdoba. 14012-Córdoba

2) CANTABRIA

Tipo de centro: Organismo Autónomo del Ministerio de Ciencia y Tecnología
Nombre: Instituto Español de Oceanografía.
CIF: Q-2823001-I
Nombre Representante Legal: Enrique Tortosa Martorell

DATOS DE LOS INVESTIGADORES EN CANTABRIA

Apellidos: Chereguini Fernández-Maqueira
Nombre: Olvido
Organismo: Instituto Español de Oceanografía.
Centro: Centro Costero de Santander.
Teléfono: 942321513
Fax: 942323486
Correo electrónico: o.chereguini@st.ieo.es
Dirección Postal: Planta de Cultivos "El Bocal" Barrio Corbanera, s/n
(Monte). 39012 Santander.

Apellidos: García de la Banda
Nombre: Inés
Organismo: Instituto Español de Oceanografía.
Centro: Centro Costero de Santander.
Teléfono: 942321513
Fax: 942323486
Correo electrónico: lnes.gbanda@st.ieo.es
Dirección Postal: Planta de Cultivos "El Bocal" Barrio Corbanera, s/n
(Monte). 39012 Santander.

Apellidos: Rasines Pérez
Nombre: Inmaculada

Organismo: Instituto Español de Oceanografía.
Centro: Centro Costero de Santander.
Teléfono: 942321513
Fax: 942323486
Correo electrónico: inma.rasines@st.ieo.es
Dirección Postal: Planta de Cultivos "El Bocal" Barrio Corbanera, s/n
(Monte). 39012 Santander.

Apellidos: Moriñigo Gutiérrez
Nombre: Miguel Angel
Organismo: Universidad de Málaga
Centro: Facultad de Ciencias. Departamento de Microbiología.
Teléfono: 952131862
Fax: 952131889
Correo electrónico: morinigo@uma.es
Dirección Postal: Facultad Ciencias, Campus Teatinos s/n, 29071 Málaga

Apellidos: Arijó Andrade
Nombre: Salvador
Organismo: Universidad de Málaga
Centro: Facultad de Ciencias. Departamento de Microbiología.
Teléfono: 952131879
Fax: 952131889
Correo electrónico: sarijo@uma.es
Dirección Postal: Facultad Ciencias, Campus Teatinos s/n, 29071 Málaga

3) CATALUÑA

Tipo de centro: Empresa Pública de I+D
Nombre: Institut de Recerca i Tecnologia Agroalimentaries (IRTA).
Generalitat de Catalunya.
CIF: Q-5855049-B
Nombre Representante Legal: Agustín Fonts Cavestany

DATOS DE LOS INVESTIGADORES EN CATALUÑA

Apellidos: Duncan
Nombre: Neil
Organismo: Institut de Recerca i Tecnologia Agroalimentaries (IRTA).
Centro: Centro de Acuicultura (CA-IRTA).
Teléfono: 977745427 ext 118
Fax: 977744138
Correo electrónico: neil.duncan@irta.es
Dirección Postal: Ctra. Poble Nou Km 6, 43540 San Carlos de la Rápita,
Tarragona

Apellidos: Trigo de Sousa Roque
Nombre: Ana

Organismo: Institut de Recerca i Tecnologia Agroalimentaries (IRTA).
Centro: Centro de Acuicultura (CA-IRTA).
Teléfono: 977745427
Fax: 977744138
Correo electrónico: ana.roque@irta.es
Dirección Postal: Ctra. Poble Nou Km 6, 43540 San Carlos de la Rápita,
Tarragona

Apellidos: Carazo Ortega
Nombre: Ignacio
Organismo: Institut de Recerca i Tecnologia Agroalimentaries (IRTA).
Centro: Centro de Acuicultura (CA-IRTA).
Teléfono: 977745427
Fax: 977744138
Correo electrónico: ignacio.carazo@irta.es
Dirección Postal: Ctra. Poble Nou Km 6, 43540 San Carlos de la Rápita,
Tarragona

4) GALICIA

Tipo de centro: Organismo Autónomo del Ministerio de Ciencia y
Tecnología
Nombre: Instituto Español de Oceanografía.
CIF: Q-2823001-I
Nombre Representante Legal: Enrique Tortosa Martorell

DATOS DE LOS INVESTIGADORES EN GALICIA

Apellidos: Peleteiro Alonso
Nombre: José Benito
Organismo: Instituto Español de Oceanografía.
Centro: Centro Oceanográfico de Vigo.
Teléfono: 986462929
Fax: 986492351
Correo electrónico: tito.peleteiro@vi.ieo.es
Dirección Postal: Cabo Estay/Canido, Apartado 1552, 36280 Vigo
Pontevedra.

Apellidos: Cal Rodríguez
Nombre: Rosa María
Organismo: Instituto Español de Oceanografía.
Centro: Centro Oceanográfico de Vigo.
Teléfono: 986462929
Fax: 986492351
Correo electrónico: rosa.cal@vi.ieo.es
Dirección Postal: Cabo Estay/Canido, Apartado 1552, 36280 Vigo
Pontevedra.

5) VALENCIA

Tipo de centro: Centro Público de I+D
Nombre: Consejo Superior de Investigaciones Científicas.
CIF: Q-2818002-D
Nombre Representante Legal:

DATOS DE LOS INVESTIGADORES EN VALENCIA

Apellidos: Mañanós Sanchez
Nombre: Evaristo
Organismo: Consejo Superior de Investigaciones Científicas.
Centro: Instituto de Acuicultura de Torre de la Sal (IATS)
Teléfono: 964319500
Fax: 964319509
Correo electrónico: evaristo@iats.csic.es
Dirección Postal: Instituto de Acuicultura de Torre de la Sal, Ribera de Cabanes s/n, 12595-Torre la Sal, Castellón.

Apellidos: Ramos Jara
Nombre: Jesús
Organismo: Consejo Superior de Investigaciones Científicas.
Centro: Instituto de Acuicultura de Torre de la Sal (IATS)
Teléfono: 964319500
Fax: 964319509
Correo electrónico: ramos@iats.csic.es
Dirección Postal: Instituto de Acuicultura de Torre de la Sal, Ribera de Cabanes s/n, 12595-Torre la Sal, Castellón.

Apellidos: Guzmán Jiménez
Nombre: José María
Organismo: Consejo Superior de Investigaciones Científicas.
Centro: Instituto de Acuicultura de Torre de la Sal (IATS)
Teléfono: 964319500
Fax: 964319509
Correo electrónico: jose@iats.csic.es
Dirección Postal: Instituto de Acuicultura de Torre de la Sal, Ribera de Cabanes s/n, 12595-Torre la Sal, Castellón.

Apellidos: Bayarri Clariana
Nombre: María José
Organismo: Consejo Superior de Investigaciones Científicas.
Centro: Instituto de Acuicultura de Torre de la Sal (IATS)
Teléfono: 964319500
Fax: 964319509
Correo electrónico: mbayarri@iats.csic.es
Dirección Postal: Instituto de Acuicultura de Torre de la Sal, Ribera de Cabanes s/n, 12595-Torre la Sal, Castellón.

2.- RESULTADOS TECNICOS DEL PLAN NACIONAL

Para describir los resultados finales del proyecto se ha seguido el formato de este formulario para cada uno de los objetivos inicialmente planteados, según se recoge a continuación para los dos objetivos generales del proyecto (A y B).

A) Aumentar el nivel de reproducción en cautividad del lenguado.

A1. Diferenciar posibles alteraciones en las pautas de cortejo sexual, así como discriminar posibles patrones de jerarquización y/o dominancia en reproductores de lenguado.

A.2. Comprobar efectos de la alimentación en la cuantía y calidad de la puesta.

A.3. Caracterizar genéticamente reproductores, y conocer el grado de contribución paterna a la progenie en tanques de reproducción.

A.4. Determinar diferencias en la calidad del esperma y ovocitos de lenguado, en función del origen de los mismos y las condiciones de cultivo.

A.5. Desarrollar y aplicar tratamientos hormonales para la estimulación de la espermiación, ovulación y puesta en el lenguado.

A.6. Utilizar ciclos de luz y temperatura artificiales para la inducción, sincronización y desplazamiento de la época de puesta del lenguado.

B) Conocer mejores condiciones zoonosanitarias para el engorde del lenguado y reducir el grado de afectación por infecciones bacterianas.

B.1. Caracterizar estirpes bacterianas en lenguados sanos y enfermos registradas en diferentes centros de investigación.

B.2. Comprobar el papel de la bacteria en la enfermedad y contar con herramientas para probar mecanismos de control o prevención.

B.3. Encontrar factores que contribuyen a desencadenar enfermedades en los lenguados.

B.4. Conocer cambios en la actividad de enzimas metabólicas del lenguado, en respuesta a diferentes condiciones de cultivo.

B.5 Valorar el efecto protector y/o inmunoestimulante en el lenguado de microorganismos probióticos.

2.1.A1. OBJETIVO INICIAL A.1

A1. Diferenciar posibles alteraciones en las pautas de cortejo sexual, así como discriminar posibles patrones de jerarquización y/o dominancia en reproductores de lenguado.

2.2.A1. OBJETIVOS REALIZADOS

1) Implementar un sistema para la observación del comportamiento del lenguado a través de video-filmación.

2) Estudiar el efecto de tres tipos de iluminación nocturna en la fisiología y el comportamiento del lenguado.

3) Describir el comportamiento reproductivo salvaje del lenguado en condiciones de cautividad.

4) Estudiar el efecto en la puesta y el comportamiento, de dos tratamientos hormonales diferentes (GnRH α y hCG), aplicados a machos de lenguado cultivados en cautividad (generación F1).

2.3.A1. METODOLOGÍA

1) *Sistema para la observación del comportamiento del lenguado.*

Se desarrolló un sistema para la observación del comportamiento del lenguado a través de video-filmación con la empresa Praesentis S.L., Sant Cugat del Vallès, Barcelona (www.praesentis.com). Los componentes esenciales del sistema son: 1) la cámara con un ángulo de campo de visión de 150° para contrarrestar el efecto de refracción del agua y filmación blanco y negro con la capacidad de filmar en condiciones de luz de 0.003 lux o luz infrarrojo (micro square camera KPC-S500B de Korea Technology and Communications Ltd, suministrado por Praesentis S.L., Barcelona) y 2) la grabadora de 8 o 4 canales (según el número de cámaras) con una capacidad alta de almacenamiento 3 tb (= 3000 mb) de video en formato mp4 y la capacidad de bajar video a discos externos a una velocidad 4 veces mayor que la grabación de videos (DVR-0404HB de Dahua Technology Co. Ltd., suministrado por Praesentis S.L., Barcelona).

Se utilizó el sistema para la observación del comportamiento del lenguado en tres experimentos para analizar el comportamiento de reproductores de lenguados mantenidos en cautividad, en condiciones de temperatura y fotoperiodo simulados al natural y con alimentación de una combinación de pienso (skretting) y alimento fresco, mejillón, calamar y gusano. Todos los tanques utilizados tenían la salida de agua por la superficie con colector de huevos.

2) Experimento del efecto de luces nocturnas

Se utilizaron 48 reproductores (media de $689,87 \pm 392,18g$) de generación F1 distribuidos 12 animales en 4 tanques (circulares diámetro de 1.7 m y capacidad de 2 m³) en un sistema de recirculación. La alimentación fue aproximadamente a las 16-17:00. Las horas de luz de día extendieron de las 07:00 a 19:00. Cada tanque tenía un toldo de lona aislante superior para controlar el fotoperiodo. La luz del día fue suministrada a cada taque con luces fluorescentes blancas y en cada tanque se aplicó un tratamiento diferente de iluminación nocturna:

Tratamiento RA: Luz roja de alta intensidad (50 lux) utilizando iluminación de luces fluorescentes de 58 w con la pantalla cubierta con un filtro rojo supergel ROSCO, que solo permite el paso de radiaciones infrarrojas y de rojo profundo >720 nm con la intensidad ajustada a 50 lux.

Tratamiento RB: Luz roja de baja intensidad (5 lux) utilizando iluminación de luces fluorescentes de 58 w con la pantalla cubierta con un filtro rojo supergel ROSCO, que solo permite el paso de radiaciones infrarrojas y de rojo profundo >720 nm con la intensidad ajustada a 5 lux, una intensidad 10 veces menor que el tratamiento RA.

Tratamiento IR: Iluminación infrarroja de dos cañones de Led infrarrojos.

Tratamiento Co: El grupo control al que no se aplicó ninguna iluminación nocturna.

Los cuatro grupos de peces recibieron los 4 tratamientos de iluminación nocturna, permaneciendo 2 semanas en cada tratamiento y siendo trasladados al finalizar este periodo a otro tratamiento. Todos los peces fueron expuestos a cada uno de los tratamientos a lo largo de los dos meses que duró el experimento. Se midió la actividad de los lenguados con sensores infrarrojos que detectan movimiento. Se colocó dos sensores por tanque a un altura de 5 y 20 cm. del fondo, todos los sensores fueron conectados a un ordenador para registrar la actividad. Al final de cada periodo de dos semanas en cada tratamiento de luz nocturna, se tomaron muestras de sangre de 6 animales (de los 12 del tanque) durante la noche (12 PM \pm 30') y de los otros 6 animales durante la mañana del día siguiente (12AM \pm 30') de tal manera que se midió la cantidad de melatonina durante el día y noche (Vera et al 2007).

3) Descripción de comportamiento reproductivo de lenguados salvajes

Se utilizaron 29 reproductores salvajes (14 hembras y 15 machos, media de $1,688 \pm 0,093$ Kg.) estabulados en el IEO Santander en un tanque rectangular (2,5m x 5,6 m y capacidad de 14 m³) con circuito abierto. La alimentación fue aproximadamente a las 11-12:00. Las horas de luz de día extendieron de las 08:00 a 24:00. Durante la noche, el tanque (cubierto por rafias) estaba iluminado con 2 fluorescentes de 58W. La pantalla de los fluorescentes estaba cubierta con un filtro rojo supergel ROSCO que permite el paso de la radiación infrarroja y de rojo profundo >720 nm pero impide el paso de las de menor longitud de onda. El

estudio del comportamiento se llevó a cabo entre los días 15 y 23 de mayo del 2008, durante 24 horas al día. Para grabar el comportamiento de los peces se

colocaron 4 cámaras subacuáticas en el tanque con una disposición que se logró capturar aproximadamente el 96% de la totalidad del tanque. Se analizaron los videos del comportamiento de dos formas: 1) análisis objetivo: para cuantificar la actividad de los peces (numero de veces que los lenguados pasaron una línea en el campo de visión del cámara) y 2) en una forma descriptiva: a) una descripción subjetiva del comportamiento reproductivo y b) una descripción de los comportamientos observados divididos en acciones individuales y organizado en un etograma para cuantificar las descripciones del comportamiento.

4) *Experimento de inducción hormonal y comportamiento de lenguados (F1)*

Se utilizaron 30 reproductores (12 hembras, media de $1305,75 \pm 273,5$ g y 18 machos, media de $966,5 \pm 179$ g) distribuidos 5 animales (2 hembras y 3 machos) en 6 tanques (circulares de diámetro de 1.7 m y capacidad de 2 m³). La alimentación fue aproximadamente a las 16-17:00. Las horas de luz se extendieron de las 07:00 a 19:00. El periodo nocturno fue iluminado con luces fluorescentes de 58 w con la pantalla cubierta con un filtro rojo supergel ROSCO, que permite el paso de radiaciones infrarrojas y de rojo profundo >720 nm. En día 0 del experimento las hembras de todos los grupos fueron implantadas con GnRHa con dosis de $50\mu\text{g}/\text{Kg}$. utilizando dos formatos, $50\mu\text{g}$ para individuos de peso aproximado a 1kg y $75\mu\text{g}$ para individuos próximos a 1,5kg. A los machos se aplicó tres tratamientos hormonales; a los machos de dos tanques se aplicó implantes de GnRHa (grupo GnRHa) en el día 0 (de la misma manera que a las hembras), a los machos de otro dos tanques se les aplicó inyecciones semanales de hCG (grupo hCG) de una dosis de 1000 IU Kg.⁻¹, comenzando una semana antes de que se aplicaran los implantes de GnRHa i.e. los días del experimento -7, 0 y 7 del experimento y a los machos de los últimos dos tanques no se les suministró ninguna hormona, grupo control. Se revisó la madurez de las hembras los días 0 y 14 del experimento y los machos el día 15 del experimento. Se evaluó la madurez de las hembras mediante una valoración visual del grado de hinchazón del abdomen utilizando el índice de maduración de Anguis & Cañavate, (2004) y para los machos se determinó el volumen total de muestra, la movilidad y tiempo de movilidad de cada muestra (protocolo adaptado de protocolo estandarizado del proyecto). El estudio del comportamiento se llevó a cabo entre los días 0 a 14 del experimento utilizando un o dos cámaras por tanque y una grabadora digital de ocho entradas. Se analizaron los videos del comportamiento en dos formas: 1) análisis objetivo: para cuantificar la actividad de los peces (numero de cambios de posición de los peces durante 6 periodos de mediá hora) y 2) en una forma subjetiva para identificar comportamiento reproductivo asociado con la puesta, como formación de una pareja, con el macho “molestando” la hembra y protegiendo a la hembra de otros machos, persecuciones de machos a machos y machos a la hembra, natación de la hembra y el macho conjunto hacia el superficie (observaciones personales Ignacio Carazo).

2.4.A1. RESULTADOS

2) Experimento del efecto de luces nocturnas

Los tres tratamientos de iluminación nocturna, RA, luz de alta intensidad de 50 lux, RB, luz de baja intensidad de 5 lux e IR luz infrarrojo permitieron visualizar e identificar los peces a través del sistema de video grabación, pero no fue posible en el grupo control (C) sin iluminación nocturna. Los patrones de actividad registrados por los sensores infrarrojos en el fondo (5cm) de cada tanque fueron similares independientemente del tratamiento de luz nocturna. El pico de actividad fue entre las 16:00 y 20:00 coincidiendo con la hora de alimentación. Comparado al pico de actividad hubo poca actividad de los lenguados durante la noche de 21:00 a 06:00. El nivel de melatonina de los lenguados a media noche (24:00) fue afectado significativamente ($P < 0.05$) por el tratamiento de luz nocturna (fig. 1). El nivel de melatonina fue significativamente ($P < 0.05$) más bajo en el tratamiento RA (50 lux) comparado a los grupos de IR y C (control). El tratamiento RB (5 lux) no tuvo diferencias significativas con los otros tres tratamientos (RA, IR y C). No hubo diferencias significativas en el nivel melatonina entre tratamientos durante el día o entre grupos de peces por la noche o el día. El nivel promedio de todos los peces durante el día fue de 44 ± 29 pg/mL lo cual fue significativamente mas bajo que el nivel encontrado en la noche 190 ± 185 pg/mL.

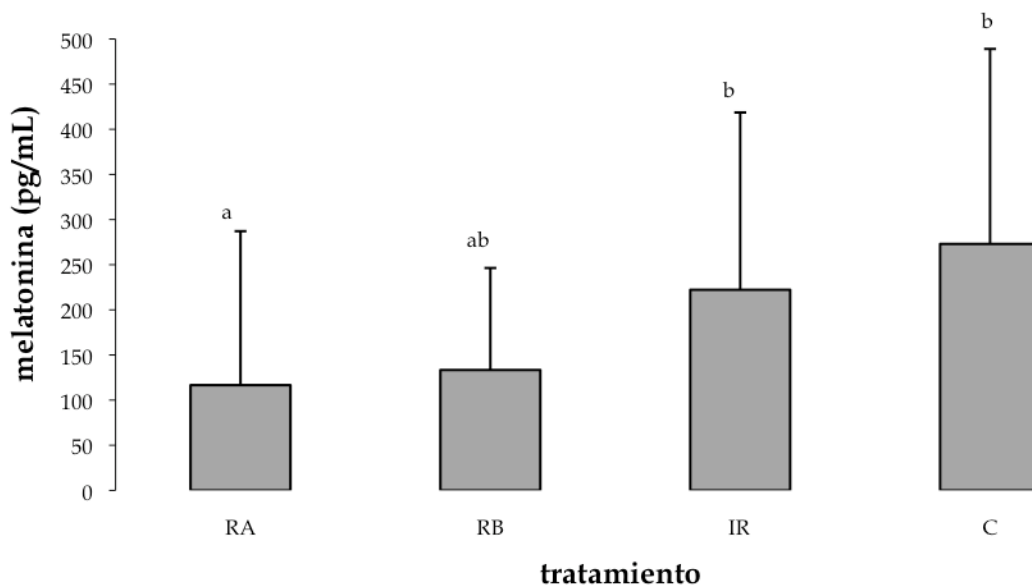


Figura 1. Promedio de nivel de melatonina durante la noche (24:00) en los cuatro tratamientos de luz nocturnal, luz rojo de 50 lux (RA), luz rojo de 5 lux (RB), luz infrarrojo (IR) y sin iluminación nocturnal control (C). Letras (a y b) diferente indican diferencias significativas ($p < 0.05$).

3) Descripción del comportamiento reproductivo de lenguados salvajes

De los colectores de huevos se recogieron un total de 6 puestas con un volumen medio de 307,85 ml y una fecundación media del 91,38%. Dos de los días presentaban huevos en diferentes estadios con diferencias entre los estadios del orden de 3 a 5 horas, lo cual indicó que hubo dos puestas por tanque durante la noche. Se observó un ligero aumento de actividad a las 12 de la mañana lo cual coincidió con la alimentación (fig. 2). El pico de actividad fue observado entre las horas de 18:00-22:00 lo cual coincidió con el comportamiento reproductivo puestas exitosas y fallidas (fig. 2). Las puestas y comportamiento reproductivo fueron observados principalmente con la luz de día antes de la media noche (24:00) pero se extendería al periodo de luz rojo utilizado en el periodo nocturno.

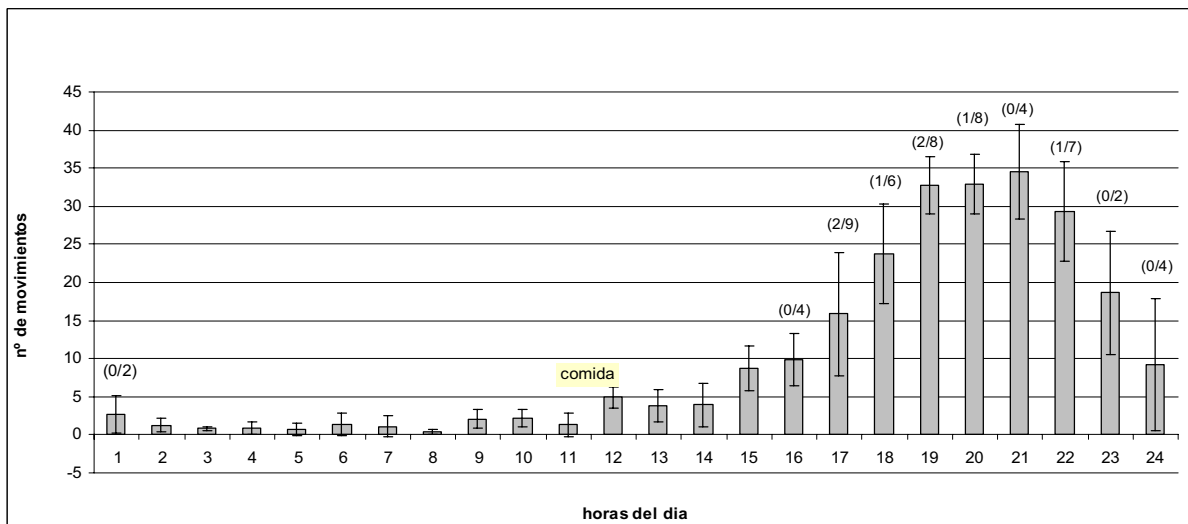


Figura 1: Promedio de movimiento por cámara registrado en relación a las horas del día. Entre paréntesis se han anotado las puestas registradas sobre (/) los intentos de cortejo registrados durante esa hora del día.

Descripción subjetiva de comportamiento reproductivo.

Se dividió el comportamiento reproductivo en cuatro pasos 0 a 3, partiendo de los periodos en los que no se aprecia intencionalidad reproductiva, hasta finalizar en la freza exitosa. Paso 0) Existen interacciones entre machos y hembras, las cuales se dan como contactos puntuales durante casi todas las horas. Sin embargo, las interacciones no indican que una hembra y un macho hayan formado una pareja o que el macho esté persiguiendo o protegiendo una hembra. Es decir que las interacciones entre los peces no indican que un pez o grupo de peces hayan centrado atención en otro pez o grupo de peces.

Paso 1) Parece que las interacciones entre los peces indican un pez o grupo de peces que han centrado su atención en otro pez o grupo de peces. Los machos se vuelven más insistentes en los contactos con las hembras (aproximaciones), el objetivo parece ser el provocar la natación de las hembras.

Puede ser rechazado lo cual se observa claramente como un temblor y alejamiento, de la hembra y el macho no vuelve a acercarse y la situación regresa a paso 0.

Alternativamente, el avance del macho puede ser permitido, lo que en muchos casos significa que no hay signos externos de rechazo y el macho se sitúa encima o sobre la hembra. Se observa una serie de comportamientos asociados a esta situación que se puede dividir en dos tipos, en el tipo 1 parece que el macho “molesta” a la hembra para provocar que despegue del fondo para nadar al superficie para la puesta o tipo 2 el macho protege la hembra de otros machos, cubre la hembra o se posiciona entre la hembra y otros machos para proteger la hembra de las avances o la atención de otros machos. Un aspecto característico del paso 1, es que muchas veces, machos externos a esta pareja puntual, persiguen a esta, persecución que a modo de juego es continuada incluso aunque la hembra desista y se pose en el suelo de nuevo. El macho continua, y el resto de machos le persiguen a el, alejándoles de la hembra, se ha observado esta persecución de hasta 2 minutos a lo largo del tanque. Finalmente, el macho inicial se posa y la persecución se detiene. A partir de este momento, el macho vuelve a buscar las interacciones con la hembra que se había posado minutos antes, y vuelve a comenzar. Este tipo de persecuciones e interacciones entre machos solo han sido observadas en el contexto de la freza, son mucho mas abundantes que el cortejo en si mismo y es probable que puedan ser utilizados de forma predictiva, para decidir en que tanque vamos a tener puesta.

Paso 2) Cuando se consigue el desplazamiento de la hembra, al menos, el macho que ha provocado la respuesta, persigue a la hembra. Cuando ésta acepta al macho (interacción permitida), comienza a nadar mas separada del suelo (natación a la superficie), el macho se introduce bajo la hembra y comienza a elevarse, subiendo con la hembra hasta la superficie y controlando su avance con la cabeza. Se han registrado subidas a la superficie del macho con la hembra en las que otros machos perseguidores seguían detrás, y estos han interferido e incluso impedido la freza (puesta fallida) interponiéndose entre el macho y la hembra en un momento en el que el macho no puede actuar como guardián o dispersarles debido a que está inmerso en el cortejo y las interacciones regresan a paso 1.

Paso 3) La hembra y el macho llegan juntos al superficie y tras unos segundos en esta situación, la hembra y el macho comienzan a liberar los gametos (freza) el paso 3 fue observado en las 8 puestas recogidas, sin variaciones.

4) Experimento de inducción hormonal y comportamiento de lenguados procedentes de cultivo (F1).

Las hembras y los machos en los diferentes grupos mostraron grados de madurez similar y no hubo diferencias significativas en la índice de madurez de las hembras o los parámetros de calidad de esperma porcentaje de movilidad, tiempo de movilidad y volumen. El promedio de la índice de madurez de las

hembras estaban entre 3 a 2,25 y los rangos de promedios entre los grupos de machos por los parámetros porcentaje de movilidad, tiempo de movilidad y volumen fueron 19,44% a 33,89%, 53,65 a 20,67 segundos y 0,5 a 0,6 mL, respectivamente.

Durante los 8 días siguientes al tratamiento con implantes se obtuvieron huevos de todos los grupos de tratamiento (4-7 noches por tanque de desove) (fig. 3), pero no se observó desarrollo de los huevos. La media de los volúmenes de los huevos recolectados Kg-1 peso corporal (PC) de hembra noche-1 entre los tratamientos no fueron significativamente diferentes y fueron $25,7 \pm 18,9$, $28,3 \pm 23,1$ y $31,3 \pm 19,6$ ml Kg.-1 noche-1, respectivamente, para los grupos de hCG, GnRH α y control (fig. 3).

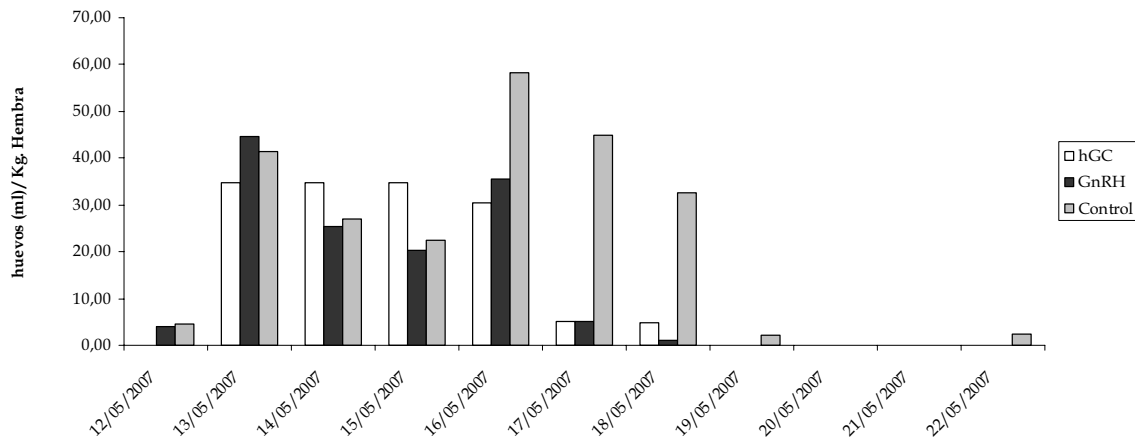


Figura 3 El volumen de huevos (mL) recogido por Kg. peso corporal de hembra por día por tratamiento hCG, GnRH α y control. Por los tratamientos hCG y control el volumen fue calculado de los dos tanques y el volumen del grupo GnRH α de un tanque.

Comportamiento

En todos los tratamientos, 20 mL o más de huevos fueron recolectados en un total de 31 veces por la mañana, indicando que una o las dos hembras habían puesto huevos durante la noche anterior. Un error no previsto en el sistema de grabación de video resultó que una proporción de las horas en que los reproductores pudieron participar en la puesta no fueron guardados. Sin embargo, no se observó el comportamiento de cortejo, durante 462 horas analizadas, o el 71% del total de 660 horas de las 11 noches (en cada uno de los 5 tanques estudiados). Además hubo dos noches (una del grupo hCG y una del grupo control) en que hubo puesta y el análisis de los videos confirmó que no hubo comportamiento reproductivo asociada con la liberación de los huevos. Actividad de los reproductores medida como el número de veces que los peces cambiaron de posición durante un período de 30 minutos fue significativamente diferente ($P < 0.05$) entre los tratamientos. Los grupos en que los machos fueron tratados con GnRH α y hCG exhibieron significativamente ($P < 0.05$) más actividad en comparación con la actividad de los peces de control. Sin embargo, no hubo diferencia en la actividad entre los sexos y no hubo interacción (tratamiento vs

sexo) que indica que el tratamiento con hormona de los machos aumentase la actividad de ambos machos y hembras.

2.5.A1. CONCLUSIONES

Parece que un luz roja de baja intensidad (<5 lux) no afectara la actividad nocturna o reproductiva del lenguado y la circulación de melatonina. Actualmente el lenguado puso huevos en las condiciones de día (luz blanca de baja intensidad a través de rafia durante las horas de 17:00 a 22:00) aplicadas en las observaciones de puestas.

Se concluyó que un requisito imprescindible para la suelta de huevos fecundados es la natación de hambre y macho durante unos segundos por la superficie del agua, para lo cual el macho eleva a la hembra. Se concluyó que hay diversas interacciones complejas entre machos de las que cabe destacar las persecuciones y la actitud de guardián, con un gran valor predictivo, las primeras acerca del día de la puesta, y la segunda acerca de la pareja reproductora del momento.

Bajo las condiciones del experimento, parece que los machos y las hembras de generación F1, no formaron parejas ni nadaron a la superficie, poniendo como se ha descrito para varias especies de peces planos y como se observaba para el especie lenguado senegalés (observaciones personales Ignacio Carazo). Podemos proponer que no hubo comportamiento reproductivo entre los machos y hembras para explicar que los huevos no fueron fecundados y por eso no se desarrollaron.

2.6.A1. VALORACIÓN

Conseguir video filmación en tanques de reproductores de lenguado ha resultado mas complicado de lo inicialmente previsto, dada la dificultad para la adquisición de imágenes con la calidad suficiente. Después de numerosos intentos se determinó la necesidad de un sistema de cámaras de un ángulo de visión amplio (150°), que funciona con poca luz (0.005 lux) y una grabadora potente para guardar y descargar video (mp4, tb) rápido para la observación del comportamiento del lenguado. Es de esperar que en el futuro inmediato se realicen mas progresos técnicos por parte del grupo de trabajo en materia de video filmación subacuática en tanque de reproductores de peces.

2.7.A1. DIFUSIÓN

Ignacio Carazo, Evaristo Mañanos, Fernando Norambuena, Neil Duncan, 2008. Preliminary observations of behaviour of Senegal sole broodstock (*Solea senegalensis*) induced to ovulate and release eggs using different male and female hormone (GnRH α and HCG) treatments." Sixth International Symposium on Fish Endocrinology, Calgary, Alberta, Canada, June 22-27, 2008.

Neil Duncan, Ignacio Carazo, Fernando Norambuena, Alicia Estevez Olvido Chereguini, Evaristo Mañanos, 2008. Reproductive behaviour of Senegal sole (*Solea senegalensis*). International Sole Workshop, Faro, Portugal, 11-13 November 2008.

2.8.A1. INCIDENCIAS DE DESARROLLO

2.9.A1. BIBLIOGRAFÍA

- Anguis, V., Cañavate, J.P., 2005. Spawning of captive Senegal sole (*Solea senegalensis*) under a naturally fluctuating temperature regime. *Aquaculture* 243: 133-145.
- Vera, LM; De Oliveira, C; Lopez-Olmeda, JF; Ramos, J; Mananos, E; Madrid, JA; Sanchez-Vazquez, FJ, 2007. Seasonal and daily plasma melatonin rhythms and reproduction in Senegal sole kept under natural photoperiod and natural or controlled water temperatura. *Journal of Pineal Research* 43: 50-55.

2.1.A2. OBJETIVO INICIAL A.2

A.2. Comprobar efectos de la alimentación en la cuantía y calidad de la puesta.

2.2.A2. OBJETIVOS REALIZADOS

Comparar el estatus nutricional entre lenguados de captura de medio salvaje y lenguados cultivados en cautividad (generación F1).

2.3.A2. METODOLOGÍA

Sistemas de cultivo

En la actualidad hay tres centros con reproductores salvajes de lenguado senegalés el Toruño (IFAPA, C.A. Andalucía), el IEO (Santander, C.A. Cantabria) y IEO (Vigo, C.A. Galicia). Los ejemplares de los dos primeros centros proceden de Cádiz y Huelva respectivamente, mientras que el origen de los ejemplares del IEO de Vigo es de Galicia. La dieta de los reproductores salvajes de los centros del Toruño (IFAPA, C.A. Andalucía) y del IEO (Santander, C.A. Cantabria) es natural, a base de mejillón *Mytilus edulis*, chipirón *Loligo vulgaris* y poliquetos *Nereis diversicolor* durante 6 días a la semana. Mientras que la alimentación de los reproductores del IEO (Vigo, C.A. Galicia) es un pienso semihúmedo (30% harina de reproductores de rodaballo (INVE) con 30% pescado azul, 30% pescado blanco y un 10% mejillón y/o calamar). En el Toruño la maduración sexual de los ejemplares y la obtención de puestas naturales se origina por las fluctuaciones naturales de la temperatura del agua de mar mientras que en los dos centros del IEO fue mediante la manipulación del termoperiodo imitando las fluctuaciones naturales registradas en el Toruño.

Recolección de tejidos para análisis en el IRTA

Treinta y cinco peces reproductores *Solea senegalensis* fueron sacrificados durante la época de desove del año 2008 (Mayo-Junio). Diecisiete peces fueron capturados con redes de enmalle en el Delta del Ebro (8 hembras y 9 machos), paralelamente dieciocho peces fueron obtenidos del un stock cultivado (F-1) estabulados en el centro de acuicultura San Carlos de la Rapita - IRTA (9 hembras y 9 machos). Los peces tenían un peso promedio de 460 ± 350 grs. El grupo de lenguados cultivados estaba estabulado en tanques rectangular de fibra de vidrio (1x3m y volumen 3000L) o circulares de fibra de vidrio (diámetro 1m y volumen 1000L) con condiciones naturales simuladas de temperatura (14.2 a 20.3°C) y fotoperiodo. Cada semana, el grupo cultivado fue alimentado a saciedad, un día con calamar, un día con poliquetos, un día con mejillón y dos días con la dieta Europa 22 Lenguado 7 (Skretting, Burgos, España). El estado de madurez de estos peces se determinó a través de cortes histológicos de gónadas. Se obtuvieron muestras de músculo, hígado y gónadas para análisis proximal y de

bioquímica (ácidos grasos), las cuales fueron colectadas y almacenadas en un congelador a -80°C .

Técnicas de laboratorio

Proteína, Carbohidratos y Lípidos Totales

Los análisis proximales se llevaron a cabo en el laboratorio de bioquímica del IRTA- San Carlos de la Rapita. Las proteínas totales se determinaron mediante de un método calorimétrico de valoración cuantitativa (Lowry et al. 1951). La determinación de los carbohidratos totales (azúcares simples, oligosacáridos, polisacáridos o de sus derivados) se llevo a cavo por el método de Dubois et al. (1956). Los lípidos totales fueron analizados por el método de Folch et al. (1957). Los lípidos son insolubles en agua, por ese motivo la extracción se hizo mediante solventes orgánicos, en este caso se realizo con cloroformo metanol (C:M), que es el método de elección cuando se necesita información sobre la fracciones lipídicas y ácidos grasos. Para la determinación de peso seco y cenizas se tomaron muestras den un peso aproximado de 2 gr de músculo, hígados y ovarios, en el caso de testículos esta muestra fue mas pequeña (100 mg). Para peso seco estos tejidos fueron secados en una estufa durante 24 horas a 100°C , posteriormente estas muestras fueron calcinadas durante 4.5 horas a 550°C , calculándose entonces el contenido de ceniza. Los datos de proteínas, carbohidratos, lípidos y cenizas se expresaron en porcentaje de peso seco (%).

Ácidos Grasos

El análisis de los ácidos grasos se realizo mediante cromatografía de gases (CG) a partir de los esteres metílicos de los ácidos grasos, también conocidos como FAMES. De esta manera pudimos obtener un cromatograma de los perfiles de ácidos grasos presentes en los extractos lipidicos. Par ello las extracciones de lípidos totales fueron transmetiladas mediante la técnica de Christie (1982), luego se extrajeron los esteres metílicos de los ácidos grasos para su posterior purificación mediante cromatografía de capa fina (TLC). Estos datos se expresaron en micro gramo de acido graso por miligramo de lípido total ($\mu\text{g}/\text{mg L}$).

2.4.A2. RESULTADOS

Durante estos tres años las puestas naturales obtenidas se han registrado y valorado diariamente, y se ha calculado la fecundidad relativa diaria, como el número de huevos obtenidos por Kg de hembra para cada puesta natural, y la fecundidad absoluta de los diferentes stocks, como la fecundidad media relativa diaria por nº de puestas, durante el periodo de reproductor de esta especie. En la Tabla I se recogen los datos registrados y calculados durante estos tres años en los tres stocks de ejemplares salvajes (STR Santander, Cádiz y Vigo).

Tabla I. Evolución de la producción, media de la fecundidad relativa diaria (10^3 huevos kg^{-1}), número de puestas, tasas de fecundación y eclosión y de la producción de larvas nacidas de los reproductores salvaje de lenguado senegalés *Solea senegalensis* en tres centros ubicados en zonas geográficas diferentes (Cadiz, STD Santander y Vigo) durante el periodo 2006-2008.

AÑO	Origen	(Total huevos $\cdot 10^6$)	Huevos flotante ($\cdot 10^6$)	% de huevos flotante	Fecundidad relativa diaria (10^3 huevos/ kg)	Nº de puestas	Tasa de Fecund.	Tasa de Eclos.	Larvas nacidas
2006	SDR	18,31	7,04	38,46	$5,05 \pm 0,4$	113	83,12	40,58	2.875.236
2007	SDR	18,05	7,68	42,58	$5,52 \pm 0,4$	124	77,35	49,45	3.694.961
2008	SDR	25,66	14,30	55,74	$5,62 \pm 0,4$	143	78,46	65,22	8.812.167
TOTAL		62,01	29,03	45,6	$5,4 \pm 0,4$	380	79,64	51,48	15.382.364
2006	Cadiz	55	40,3	73,3	$12,3 \pm 7,2$	151	63,00	62,00	16.021.180
2007	Cadiz	21	10,7	51,2	$7,8 \pm 1,2$	14	54,30	35,70	2.274.206
2008	Cadiz	18	6,8	37,6	$5,9 \pm 0,9$	82	48,60	$29,5 \pm 6,2$	1.105.560
TOTAL		94	57,8	54	$8,7 \pm 3,1$	347	55,30	42,40	19.400.946
2006	Vigo	12,63	5,65	44,73	$4,02 \pm 3,02$	90	60,09	86,55	1.945.720
2007	Vigo	10,17	4,37	42,97	$2,90 \pm 2,50$	72	47,24	74,38	2.359.984
2008	Vigo	16,03	5,59	34,87	$2,62 \pm 2,06$	75	52,02	39,16	1.420.462
TOTAL		38,83	15,61	40,86	$3,18 \pm 2,53$	237	53,12	66,70	5.726.166

Como puede observarse en el stock de Cádiz hay un decrecimiento en el número de puestas y en la producción a lo largo de estos años que indicaría un envejecimiento del stock mientras que en el stock de Santander se observa un incremento que podría estar relacionado o bien con una mejor adaptación a la cautividad de los ejemplares o como resultado de la reestructuración del stock acometida en el 2007 atendiendo a los resultados de los análisis genéticos realizados.

Por otro lado, hay cinco centros que tienen reproductores de primera generación (F1) de lenguado cultivado: el Toruño IFAPA (Cádiz, C.A. Andalucía), el IEO (Santander, C.A. Cantabria) y IEO (Vigo, C.A. Galicia), IATS (Castellón, C.A. Valencia) y IRTA (Tarragona, C.A. Cataluña). Con los reproductores de primera generación (F1) de lenguado cultivado el Toruño y el IEO de Santander se ha realizado un estudio para comprobar los efectos de la alimentación en la cuantía de la puesta y en la calidad de la misma. Un grupo de ejemplares se alimentaron con pienso comercial para reproductores (Skretting) y otro grupo con alimento natural a base mejillón *Mytilus edulis*, chipirón *Loligo vulgaris* y poliquetos *Nereis diversicolor*, durante 6 días a la semana. El IATS ha participado en este estudio con la realización de análisis hormonales mediante inmunoensayos específicos ELISA para el lenguado, sobre muestras sanguíneas obtenidas de estos reproductores de lenguado. El IATS con el stock de lenguado cultivado, procedente de huevos del IFAPA, estabulado bajo condiciones naturales de luz y temperatura y una alimentación natural ha puesto a punto y

validado 4 inmunoensayos ELISA específicos para el lenguado, para el análisis de vitelogenina (VTG) y de tres esteroides sexuales, estradiol (E2), testosterona (T) y 11-ketotestosterona (11KT) para el análisis de vitelogenina (VTG) y de tres esteroides sexuales, estradiol (E2), testosterona (T) y 11-ketotestosterona (11KT).

Como puede observarse en la Tabla II la producción total de huevos ha sido mayor en los lenguados con dieta natural *versus* pienso. Además los lenguados cultivados con alimento natural presentaron un mayor crecimiento, mientras que los alimentados con pienso un mayor factor de condición. Ninguna de las puestas fueron fecundadas, a excepción de la F1 del Toruño donde se han obtenido algunas puestas durante los años 2006 y 2007, con tasas de fecundación y eclosión similares a las de los ejemplares salvajes, sin embargo a partir del 2008 nos se han registrado más.

Tabla II Evolución de la producción, tasas de fecundación y eclosión de larvas de reproductores de primera generación (F1) de lenguado senegalés cultivado *Solea senegalensis* en los centros de Cádiz, Santander y IATS durante el periodo 2006-2008.

REPRODUCTORES DE <i>Solea senegalensis</i> DE ORIGEN CULTIVADO							
Origen		Alimento PIENSO			Alimento NATURAL		
		2006	2007	2008	2006	2007	2008
STR	Producción total (*10 ³ huevos kg-1)	53,97	36,03	25,5	31,2	166,9	272,8
	Tasa de fertilización (%)	-	-	-	-	-	-
	Tasa de eclosión (%)	-	-	-	-	-	-
	Nº Puestas	11	11	15	7	30	62
Cádiz	Producción total (*10 ³ huevos kg-1)	405	148	-	120	300	685
	Tasa de fertilización (%)	79 ±3,5	57,4±4,3	-	84,5±2,9	60,1±9,3	57±4,2
	Tasa de eclosión (%)	16±3	23±4	-	19,3±5	36,1±12,4	45±5,8
	Nº Puestas						
IATS	Producción total (*10 ³ huevos kg-1)				360	443	104
	Tasa de fertilización (%)				-	-	-
	Tasa de eclosión (%)				-	-	-
	Nº Puestas				35	29	12

A partir de los análisis de estado nutricional llevados a cabo en el IRTA se desprende lo siguiente.

Proteína: Los contenidos de proteína en músculo mostraron valores con un rango de 70,1 a 73,3 % en peso seco, tanto en los grupos salvajes como de cultivo, situación similar fue obtenida en grupos de macho y hembras (tabla 3). Esta homogeneidad también se observó en gónadas (ovarios) el porcentaje de proteína fue de un 57 %, no observándose variación entre los grupos de hembras salvajes y las de cultivo (tabla 5). En hígados en tanto, los valores de proteína fueron significativamente más altos en peces de cultivo, tanto en machos como en hembras (tabla 4) ($p < 0.05$). Las hembras salvajes mostraron una reducción

comparativa de un 34 % con respecto a las de cultivo, sin embargo en el caso de los machos los valores promedios fueron un 85 % más bajo con respecto a los machos salvajes.

Tabla 3. Análisis proximal en músculos de lenguados machos y hembras, salvajes y cultivados.

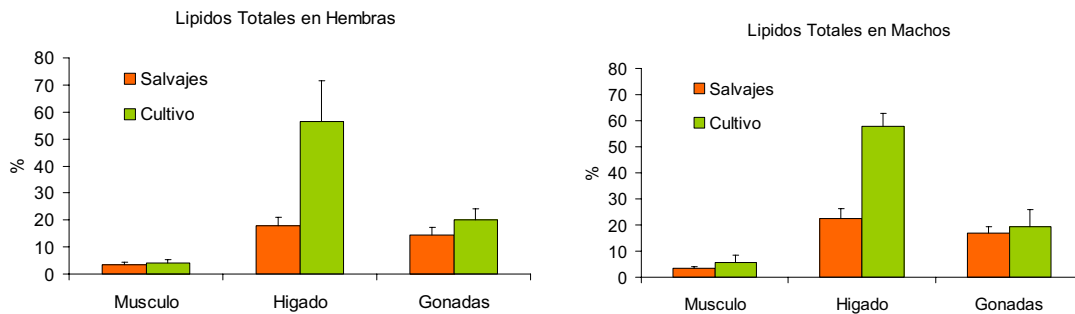
% Peso Seco	Salvajes				Cultivo			
	Hembras		Machos		Hembras		Machos	
	Promedio	SD	Promedio	SD	Promedio	SD	Promedio	SD
Proteína	72,3	8,7	73,3	4,3	72,6	5,0	70,1	7,3
Carbohidratos	3,7	0,8	4,0	0,5	4,5	0,8	4,2	0,8
Lípidos	3,3	0,9	3,3	0,6	3,9	1,4	5,6	2,7
Ceniza	1,5	0,2	1,4	0,2	1,6	0,2	1,5	0,1
Peso Seco	22,9	1,8	23,2	1,1	23,9	1,2	23,9	1,7

Tabla 4. Análisis proximal en Hígados de lenguados machos y hembras, salvajes y cultivados.

% Peso Seco	Salvajes				Cultivo			
	Hembras		Machos		Hembras		Machos	
	Promedio	SD	Promedio	SD	Promedio	SD	Promedio	SD
Proteína	47,2	3,1	48,3	5,3	35,7	6,9	26,0	5,6
Carbohidratos	15,4	8,4	23,9	14,1	12,6	5,5	18,6	13,9
Lípidos	17,9	3,1	22,5	3,9	56,4	15,0	57,8	5,1
Ceniza	1,9	0,4	1,3	0,3	0,9	0,3	1,4	1,2
Peso Seco	27,7	1,9	28,1	2,1	37,5	7,6	44,3	4,6

Tabla 5. Análisis proximal en gónadas de lenguados machos y hembras, salvajes y capturados.

% Peso Seco	Salvajes				Cultivo			
	Hembras		Machos		Hembras		Machos	
	Promedio	SD	Promedio	SD	Promedio	SD	Promedio	SD
Proteína	59,1	6,6	--	--	56,3	3,8	--	--
Carbohidratos	8,7	2,3	--	--	7,9	1,6	--	--
Lípidos	14,3	2,8	16,9	2,5	20,1	4,2	19,5	6,3
Ceniza	1,8	0,2	0,9	0,6	1,9	0,4	0,7	0,5
Peso Seco	24,0	3,1	16,9	2,5	26,3	4,7	15,3	1,4



a) b)
 Figura. 1. Contenido de lípidos totales en músculo, hígados y gónadas de lenguados salvajes y cultivados (F-1). a) Grupo de hembras y b) grupo de machos

Carbohidratos: Los valores de carbohidratos en músculo fueron en el rango de 3.7 a 4.5%, no observándose variaciones entre los diferentes grupos (tabla 3), situación similar ocurrió en los ovarios de las hembras, que mostraron valores cercanos al 8% (tabla 5). En hígados el porcentaje de carbohidratos en el grupo de machos salvajes mostró valores máximos cercanos al 24%. Los demás grupos mostraron concentraciones por debajo del 18% (tabla 4).

Cenizas y peso seco: Los valores de cenizas en músculo, hígado y gónadas fueron bastante homogéneos, observándose que en general estos datos fluctúan en el rango de 0.7 (testículos de lenguados de cultivo) a 1.9 % (ovarios de hembras de cultivo y hígado de hembras salvajes) (Tabla 1, 2 y 3). El peso seco presento una variación entre 16.9 (testículo de machos salvajes) a 44.3 % (hígado de machos cultivados) (Tabla 3, 4 y 5).

Lípidos: Los valores de lípidos totales, fueron más altos en los peces cultivados tanto en hembras como en machos. Esta tendencia se vio claramente marcada en todos los tejidos analizados (tabla 3, 4 y 5). En músculo, machos cultivados este valor alcanzo el 5.6%, en tanto los salvajes mostraron valores cercanos al 3% (tabla 3, Fig. 3). En ovarios de peces F-1 se obtuvieron valores promedio de un 20% de lípido, en las hembras salvajes este valor es 14% (tabla 5, Fig. 1a). Sin embargo las diferencias mas significativas se observaron en hígados ($p < 0.01$), en el caso de las hembras de cultivo se obtuvo un 56% en tanto en las salvajes este valor es 17% (229% de incremento) (tabla 4). Situación similar ocurrió en machos F-1, en los que se obtuvieron valores promedio cercanos al 58% en tanto los salvajes llegaron a un 23% (152% de incremento) (Fig. 1).

Ácidos grasos

Músculo: En muchos de los grupos de ácidos grasos no se observaron diferencias entre peces salvajes y F-1. Este es el caso de ácidos grasos saturados (SFAs), poli insaturados PUFAs (n-3) y docosahexaenoico (DHA). En

otros ácidos grasos como, los altamente saturados (HUFAs) y poli insaturados PUFAs (n-6) se observó un incremento en la concentración en peces F-1. Situación similar ocurrió en caso de ácido graso eicosapentaenoico (EPA) en hembras cultivadas (Tabla 6, Fig. 2a). Las concentraciones de ácido graso arachidonic (ARA) mostraron diferencias altamente significativas en la concentración en músculo ($p < 0.01$). Observándose una reducción del 94% en hembras cultivadas. En el caso de los machos esta reducción llegó al 140% (Tabla 6, Fig. 2b).

Tabla 6. Análisis de ácidos grasos en músculo de lenguados salvajes y de cultivo (F-1).

ug/mg L	Salvajes				Cultivo			
	Hembras Promedio	SD	Machos Promedio	SD	Hembras Promedio	SD	Machos Promedio	SD
SFA	151,7	31,4	128,7	20,2	159,9	63,0	172,7	31,4
HUFA	82,6	19,1	74,1	19,1	100,3	41,3	118,0	28,8
PUFA (n-3)	272,3	65,6	276,1	55,3	263,3	79,0	272,8	72,2
PUFA (n-6)	33,6	5,8	36,1	9,8	54,3	17,1	66,8	28,2
EPA	34,4	9,3	36,2	7,2	42,3	15,9	32,0	13,9
DHA	185,6	48,8	188,4	40,7	165,6	50,8	176,2	46,2
ARA	24,4	4,7	28,2	9,2	12,6	3,7	11,9	5,0
T FA	547,7	86,2	549,1	86,6	585,4	193,3	640,1	140,1
T Lipid (%)	3,3	0,9	3,3	0,6	3,9	1,4	5,6	2,7
n-3/n-6	8,07	1,08	7,84	1,43	4,97	0,95	4,39	1,37
EPA/ARA	1,40	0,18	1,37	0,38	3,41	0,94	2,88	1,28
DHA/ARA	24,42	4,68	28,20	9,22	12,64	3,73	11,91	5,01
EPA/DHA	0,19	0,04	0,20	0,04	0,25	0,04	0,18	0,05

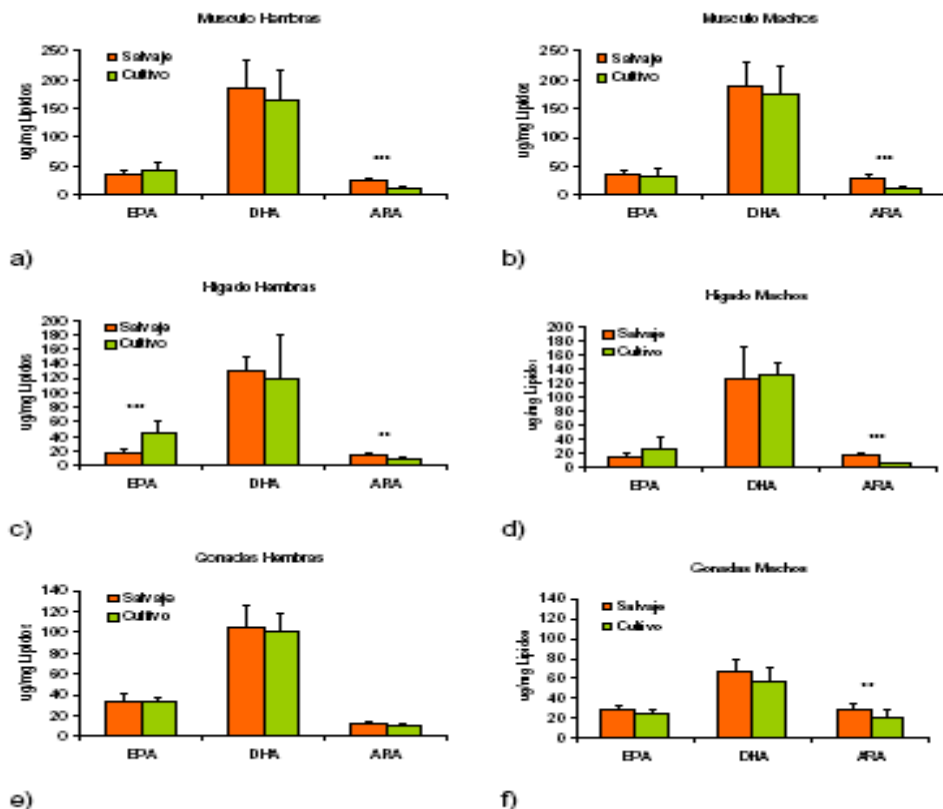


Figura 2. Ácidos grasos esenciales en a) músculos, b) hígados y c) gónadas de lenguados salvajes y de cultivo (F-1).

Hígado: La concentración de ácidos grasos saturados (SFAs) y docosahexaenoico (DHA) no variaron significativamente entre peces salvajes y cultivados (F-1), esta situación se mantuvo tanto para hembras como machos ($p < 0.05$). Sin embargo la concentración de ácidos altamente saturados (HUFAs), PUFAs (n-3) y PUFAs (n-6) mostraron un aumento significativo en peces cultivados.

El aumento mas significativo se observó en la concentración de eicosapentaenoico (EPA) en los peces cultivados (Tabla 7, Fig. 2c y 2d). Este ácido graso mostró valores significativamente mas altos en el caso de la hembras F-1. Observándose un incremento del 148% con respecto a las hembras salvajes ($p < 0.01$). En el caso del ácido graso araquidónico (ARA), se determino una situación muy similar a la ocurrida en el músculo. Los machos F-1 mostraron una reducción altamente significativa con respecto a los machos salvajes ($p < 0.01$) (Tabla 7, Fig. 2d), calculándose una reducción del orden del 215%. En el caso de las hembras F-1, comparadas con las salvajes, esta reducción fue menor pero igualmente significativa, del orden del 57% ($p < 0.05$) (Tabla 7, Fig. 2c).

Tabla 7. Análisis de ácidos grasos en hígados de lenguados salvajes y de cultivo (F-1).

ug/mg L	Salvajes				Cultivo			
	Hembras		Machos		Hembras		Machos	
	Promedio	SD	Promedio	SD	Promedio	SD	Promedio	SD
SFA	162,58	13,09	143,02	15,22	152,39	19,54	160,38	15,22
HUFA	140,64	45,09	113,44	20,49	177,50	26,53	175,19	31,80
PUFA (n-3)	190,49	21,14	189,24	65,37	252,07	118,20	233,18	33,29
PUFA (n-6)	26,68	6,34	29,92	5,11	103,95	26,81	82,29	16,36
EPA	17,97	4,43	14,25	5,83	44,62	16,72	27,49	14,45
DHA	131,10	19,00	127,96	44,55	120,45	58,80	130,72	17,88
ARA	13,60	4,35	17,04	4,24	8,65	3,03	5,39	0,76
T FA	524,16	65,37	482,21	95,69	694,94	169,46	660,23	37,92
T Lipid (%)	18,11	3,24	22,46	3,88	56,44	15,04	57,80	5,09
n-3/n-6	7,51	2,00	6,41	2,24	2,36	0,44	2,95	0,77
EPA/ARA	1,42	0,47	0,86	0,37	5,19	0,93	4,97	3,00
DHA/ARA	13,60	4,35	17,04	4,24	8,65	3,03	4,79	1,93
EPA/DHA	0,14	0,05	0,11	0,02	0,38	0,07	0,18	0,12

Gónadas: Los ácidos grasos saturados (SFA), los altamente saturados (HUFAs) y los poli insaturados (PUFAs (n-3)), mostraron concentraciones bastante similares en los grupos salvajes y cultivados (F-1). Sin embargo en testículos estos valores se presentan más bajos que en los ovarios. En el caso de los poli insaturados (PUFAs (n-6)) el grupo F-1 mostró valores significativamente mas alto que los salvajes ($p < 0.05$), siendo es incremento mayor en el caso de las hembras (125% mas alto en F-1) que el de los machos (58% mas alto en F-1). Tanto en hembras como en machos los valores de eicosapentaenoico (EPA) y docosahexaenoico (DHA) no mostraron diferencias estadísticas ($p > 0.05$) (Fig. 2e

y 2f). Similar situación se observó en el caso del ácido graso arachidónico (ARA). Los grupos de hembras salvajes y F-1, no mostraron mayores diferencias, sin embargo esta situación fue diferente en el caso de los machos. El grupo F-1, mostró una reducción significativa con respecto al grupo salvaje ($p < 0.05$). Esta reducción en F-1 fue de un 40% con respecto a los salvajes.

Tabla 8. Análisis de ácidos grasos en gónadas de lenguados salvajes y de cultivo (F-1).

ug/mg L	Salvajes				Cultivo			
	Hembras		Machos		Hembras		Machos	
	Promedio	SD	Promedio	SD	Promedio	SD	Promedio	SD
SFA	148,78	17,06	106,96	20,44	137,53	13,76	115,71	11,59
HUFA	118,1	17,0	100,0	22,3	123,1	13,4	79,4	11,7
PUFA (n-3)	196,1	35,7	122,7	34,2	184,7	29,7	103,6	16,2
PUFA (n-6)	27,7	4,2	37,0	9,0	61,3	6,0	58,8	10,6
EPA	33,6	6,6	29,1	10,6	33,3	3,9	24,6	3,4
DHA	104,2	21,8	67,0	18,3	100,6	18,0	57,3	12,7
ARA	12,5	2,0	28,0	6,4	10,6	1,9	20,8	7,3
T FA	502,0	65,2	381,6	82,6	520,1	48,4	371,1	38,6
T Lipid (%)	14,3	2,8	16,9	2,5	20,1	4,2	19,5	6,3
n-3/n-6	7,1	1,2	3,3	0,4	3,0	0,4	1,8	0,2
EPA/ARA	2,7	0,5	1,0	0,2	3,2	0,5	1,3	0,4
DHA/ARA	10,9	4,8	28,0	6,4	10,6	1,9	20,8	7,3
EPA/DHA	0,3	0,0	0,4	0,1	0,3	0,0	0,4	0,1

Ratios EPA/ARA y DHA/ARA:

Los ratios de EPA/ARA mostraron diferencias altamente significativas entre los grupos salvajes y F-1, especialmente en hígados y músculo ($p < 0.01$). Observándose valores de ratio EPA/ARA altos en el caso de los peces cultivados y comparativamente más bajos en el grupo de peces salvajes. Esta situación se observó tanto en machos como en hembras. En el caso de las gónadas (machos y hembras) estas diferencias no alcanzaron a ser significativas ($p > 0.05$) (Fig. 3a y 3b).

En los ratios DHA/ARA los valores en peces cultivados muestran tendencias más altas que en los salvajes. Estas tendencias se ven más pronunciadas en el caso de los machos, especialmente en hígados y músculos. En los ovarios y testículos los ratios de DHA/ARA tienden a ser más homogéneos entre los grupos, no observándose diferencias significativas ($p > 0.05$) (Fig. 3c y 3d).

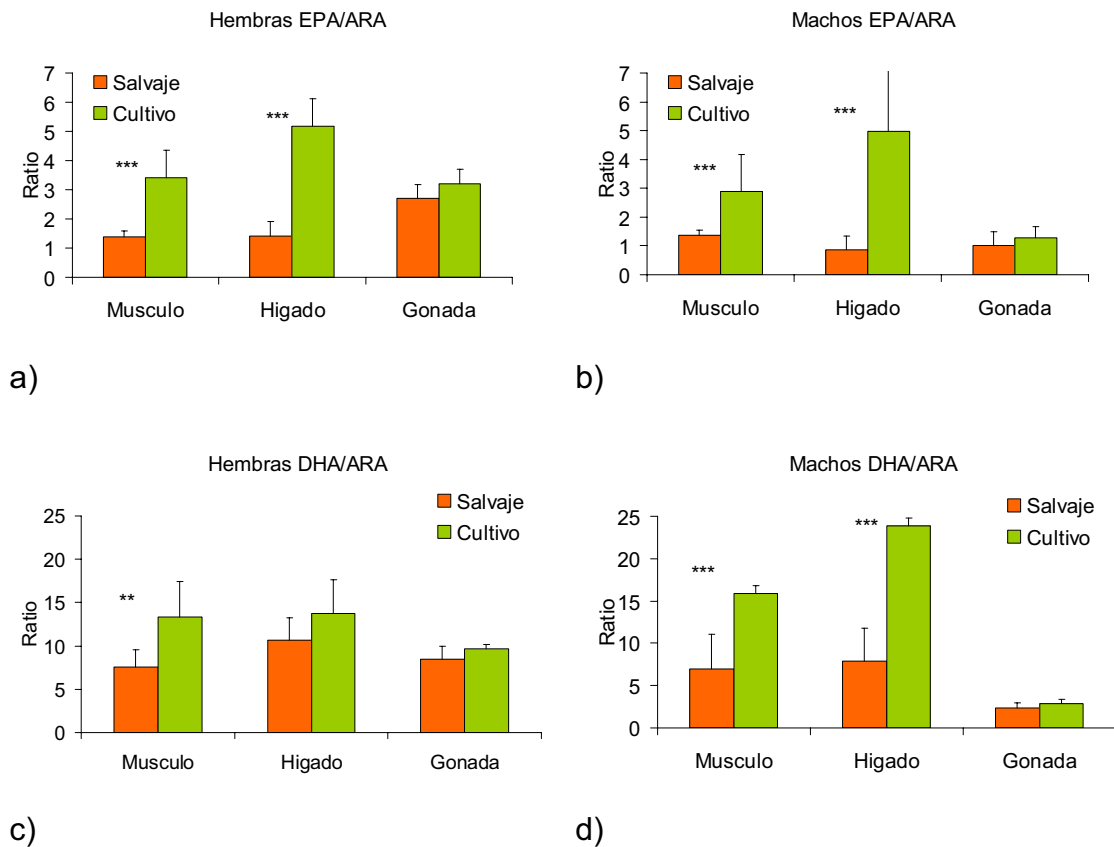


Figura 3. Ratio de ácidos grasos esenciales obtenidos en músculo, hígados y gónadas en peces salvajes y de cultivo (F-1).

2.5.A2. CONCLUSIONES

Generalmente los lenguados de cultivo presentaron un aumento significativo en lípidos principalmente en el hígado y parcialmente en las gónadas, lo cual ha afectado el balance de macro nutrientes. Además los lípidos de los lenguados de cultivo tienen un patrón de ácidos grasos diferente de los lenguados salvajes generalmente presentando valores mas altos de EPA y valores mas bajos de ARA.

Macro nutrientes

Las concentraciones de proteína en músculo fueron del orden del 72% (rango 70.1 – 73.3) tanto en salvajes como en cultivo. En hígados F-1, las concentraciones fueron de un 35.7 y 26 % y en salvajes de un 47.2 y 48.3 % del peso seco, en los ovarios estos valores fueron 59.1 y 56.3 respectivamente en hembras salvajes y F-1.

Los carbohidratos, tanto en músculo como en ovarios no mostraron diferencias entre grupos, observándose valores cercanos a un 4% en músculo y de un 8 % en ovarios. Sin embargo en los peces F-1 se encontraron valores mas

altos, en promedio se determinó en hembras un 15% y en machos un 24% en peso seco.

Los lípidos mostraron valores bastante similares entre grupos, muy cercanos a el 3% excepto en machos cultivados que este valor llegó al 5.6%. En gónadas los peces de cultivo mostraron más acumulación de lípidos, en el caso de las hembras estos valores fueron del orden del 20%, en tanto las salvajes mostraron valores cercanos al 14%. En tanto en testículos de peces salvajes y F-1 estos valores fueron de un 20 % y 17% respectivamente. El hígado fue el órgano que mostró mayor acumulación de lípidos. En el caso de los salvajes este valor llegó a un 20% sin embargo en los F-1 este valor llegó en promedio a un 57% del peso seco.

Ácidos Grasos Esenciales (EFAs)

El ácido graso araquidónico (ARA) fue el que mayores diferencias de concentración mostró al comparar peces salvajes y F-1. La concentración de ARA fue siempre mayor en peces salvajes, tanto en hembras como en machos. En el caso de los músculos, estas diferencias fueron de un 113%, en hígado de un 118% y en testículo de un 40%. Sin embargo en ovarios las concentraciones en ambos grupos fueron homogéneas.

El ácido graso eicosapentanoico (EPA) mostró una clara tendencia a acumularse más en peces de cultivo (F-1) que en salvajes. En el caso del hígado, esta diferencia en acumulación en hembras fue de un 160%.

El ácido graso docosahexaenoico (DHA) no mostró diferencias significativas entre los grupos salvajes y cultivados, observándose las máximas concentraciones en el hígado.

En general tanto EPA, ARA y DHA como los ratios EPA/ARA y DHA/ARA mostraron valores muy similares en las gónadas de tanto peces salvajes como procedentes de cultivo.

2.6.A2. VALORACIÓN

2.7.A2. DIFUSIÓN

XIII International Symposium on Fish Nutrition and Feeding, XIII ISFNF, Florianópolis, Brasil, 2008 Presentación poster, autores y título: Norambuena, F., Estevez, A., Andres, M., Carzo, I., Duncan, N., Preliminary comparison of nutritional status of wild and cultured broodstock of senegal sole (*Solea senegalensis*).

2.8.A2. INCIDENCIAS DE DESARROLLO

2.9.A2. BIBLIOGRAFÍA

2.1.A3. OBJETIVO INICIAL A.3

A.3. Caracterizar genéticamente reproductores, y conocer el grado de contribución paterna a la progenie en tanques de reproducción.

2.2.A3.OBJETIVOS REALIZADOS

Caracterización de la genética e inter-relación (presencia de hermanos y medio-hermanos) de los tres stocks de lenguados cautivos (generación F1) y el stock de peces salvajes provenientes del Delta del Ebro.

2.3.A3. METODOLOGÍA

Se tomaron muestras de sangre de todos los ejemplares de reproductores de lenguado en el IRTA y se extrajo el ADN para el análisis de paternidad por microsatélites. Un método de precipitación salina fue utilizado para extraer la ADN de las muestras. Se caracterizó 4 stocks; 95 individuales del stock cultivados 1 (Cult1), cultivados en IEO Santander a partir de huevos de El Turuño clase de año 2003, 16 individuales del stock cultivados 2 (Cult2) cultivados en IEO Santander a partir de huevos de El Turuño clase de año 2002, 19 individuales del stock cultivados 3 (Cult3) cultivados en ABSA, Culmarex, Mallorca a partir de huevos de El Turuño clase de año 2002, y 52 individuos del stock salvajes (SalvDE) capturados en la costa del Delta de Ebro.

La caracterización genética fue completada por AquaSolutions Biotech S.L. Málaga utilizando los siguientes métodos:

1. Genotipado de las muestras

El genotipado de cada muestra se ha realizado mediante el estudio de 8 loci microsatélite (AY426693, AF441390, AF441389, AF441387, AF441386, AB177534, AF441385 y Smax2). Los productos de las reacciones fueron analizados utilizando un secuenciador automático ABI 310 (Applied Biosystems). El tamaño de los alelos fue determinado y revisado con el software Genotyper Versión 3.7.

2. Caracterización genética de la población y sub-poblaciones

Para la caracterización genética de las muestras se ha empleado el software Fstat V. 2.9.3 (Goudet 2001) para el cálculo de los siguientes parámetros: Número de alelos (K), Número de alelos corregido por el tamaño de la muestra (K') (Mousadik y Petit 1996), Heterocigosidad observada y esperada (H_o y H_e respectivamente), Contenido de información polimórfica (PIC) (Botstein et al 1980), Valores de exclusión 1 y 2 (Excl 1 y Excl 2 respectivamente) (Marshall et al 1999, Chakravarti y Li 1983) grado de conformidad con respecto a las condiciones de equilibrio de Hardy-Weinberg (Fis) (Wright 1969). Para

caracterización genética de las subpoblaciones se han empleado los parámetros anteriormente mencionados.

3. Comparación genética entre subpoblaciones

A partir de las cuatro poblaciones anteriormente mencionadas se han calculado los valores de diferenciación genética F_{st} (Weir & Cockerham, 1984) entre las distintas subpoblaciones.

4. Comparación genética de las distintas subpoblaciones con respecto a una población de referencia

Como grupo de referencia externo se ha utilizado una población de *S. senegalensis* de origen salvaje, capturada en las costas del Atlántico sur (Cádiz). Este grupo (SalvAt) representa una población estable y homogénea.

5. Estimación de los valores de parentescos entre individuos

El estudio de los valores de parentesco entre pares de individuos se ha llevado a cabo mediante el estimador R_{xy} de (Queller y Goodnight 1989). Las frecuencias alélicas empleadas corresponden al total de individuos muestreados. En esta tarea se empleó el software Kinship Vers. 1.3.1 (Goodnight y Queller, 1999).

2.4.A3. RESULTADOS

Caracterización genética de la población

La caracterización genética (Tablas 1-4) revela que el stock analizado representa una población heterogénea desde el punto de vista genético con frecuencias alélicas con un desequilibrio significativo frente a las proporciones esperadas según Hardy-Weinberg, fundamentado en un efecto Wahlund. Los parámetros genéticos indican niveles medios de variabilidad genética en este grupo.

Tabla 1. Caracterización genética de la muestra Cultivados 1. Número de alelos (K), Número de alelos corregido por el tamaño de la muestra (K'), Heterocigosidad observada y esperada (H_o y H_e respectivamente), Contenido de información polimórfica (PIC), Valores de exclusión 1 y 2 (Excl 1 y Excl 2 respectivamente), grado de conformidad con respecto a las condiciones de equilibrio de Hardy-Weinberg (Fis).

Locus	k	k'	H(O)	H(E)	PIC	Excl(1)	Excl(2)	Fis
Smax2	15	8,628	0,720	0,800	0,777	0,454	0,631	0,1
GATA	15	9,049	0,699	0,818	0,797	0,486	0,66	0,146
Sol14	18	10,030	0,935	0,881	0,864	0,603	0,753	-0,062
Sol9	16	8,007	0,860	0,814	0,786	0,462	0,635	-0,057
Sol13	14	7,893	0,753	0,797	0,771	0,441	0,619	0,055
Sol19	5	4,527	0,775	0,718	0,662	0,294	0,463	-0,08
CA13	10	7,371	0,734	0,850	0,827	0,522	0,69	0,137
SolMII	12	7,114	0,745	0,798	0,770	0,435	0,614	0,067
Total	13,13	7,827	0,778	0,809	0,782	0,994	0,9997	Alt. Signif.

Tabla 2. Caracterización genética de la muestra Cultivados 2. Número de alelos (K), Número de alelos corregido por el tamaño de la muestra (K'), Heterocigosidad observada y esperada (Ho y He respectivamente), Contenido de información polimórfica (PIC), Valores de exclusión 1 y 2 (Excl 1 y Excl 2 respectivamente), grado de conformidad con respecto a las condiciones de equilibrio de Hardy-Weinberg (Fis).

Locus	k	k'	H(O)	H(E)	PIC	Excl(1)	Excl(2)	Fis
Smax2	6	5,617	0,750	0,690	0,624	0,262	0,436	-0,091
GATA	6	5,565	0,688	0,631	0,564	0,212	0,377	-0,093
Sol14	7	6,732	0,933	0,839	0,784	0,447	0,623	-0,117
Sol9	7	6,403	1,000	0,724	0,653	0,295	0,465	-0,399
Sol13	5	4,437	0,500	0,460	0,406	0,104	0,242	-0,091
Sol19	4	3,970	0,750	0,700	0,616	0,249	0,41	-0,075
CA13	7	6,433	0,688	0,780	0,718	0,36	0,537	0,122
SolMII	5	4,752	0,563	0,615	0,539	0,193	0,347	0,088
Total	5,88	5,489	0,734	0,680	0,613	0,921	0,990	Alt. Signif.

Tabla 3. Caracterización genética de la muestra Cultivados 3. Número de alelos (K), Número de alelos corregido por el tamaño de la muestra (K'), Heterocigosidad observada y esperada (Ho y He respectivamente), Contenido de información polimórfica (PIC), Valores de exclusión 1 y 2 (Excl 1 y Excl 2 respectivamente), grado de conformidad con respecto a las condiciones de equilibrio de Hardy-Weinberg (Fis).

Locus	k	k'	H(O)	H(E)	PIC	Excl(1)	Excl(2)	Fis
Smax2	11	9,958	0,947	0,886	0,849	0,571	0,729	-0,071
GATA	10	8,181	0,474	0,629	0,596	0,239	0,431	0,252
Sol14	12	10,247	0,842	0,881	0,843	0,56	0,719	0,045
Sol9	9	8,007	0,722	0,824	0,775	0,442	0,618	0,126
Sol13	10	9,034	0,947	0,858	0,817	0,512	0,68	-0,108
Sol19	5	4,658	0,842	0,733	0,661	0,292	0,462	-0,154
CA13	7	6,353	0,684	0,754	0,705	0,347	0,531	0,095
SolMII	7	6,268	1,000	0,794	0,738	0,383	0,561	-0,269
Total	8,88	7,838	0,807	0,795	0,748	0,988	0,9994	Alt. Signif.

Tabla 4. Caracterización genética de la muestra Salvajes (SalvDE). Número de alelos (K), Número de alelos corregido por el tamaño de la muestra (K'), Heterocigosidad observada y esperada (Ho y He respectivamente), Contenido de información polimórfica (PIC), Valores de exclusión 1 y 2 (Excl 1 y Excl 2 respectivamente), grado de conformidad con respecto a las condiciones de equilibrio de Hardy-Weinberg (Fis).

Locus	k	k'	H(O)	H(E)	PIC	Excl(1)	Excl(2)	Fis
Smax2	7	7	0,867	0,846	0,792	0,459	0,634	-0,025
GATA	12	12	0,867	0,901	0,858	0,59	0,743	0,04
Sol14	10	10	0,846	0,892	0,842	0,553	0,715	0,054
Sol9	7	7	0,571	0,706	0,627	0,272	0,436	0,197
Sol13	7	7	0,933	0,779	0,716	0,359	0,537	-0,206
Sol19	6	6	0,733	0,775	0,714	0,354	0,535	0,055
CA13	7	7	0,571	0,688	0,633	0,27	0,455	0,175
SolMII	7	7	0,800	0,834	0,781	0,447	0,624	0,043
Total	7,88	7,88	0,774	0,803	0,745	0,988	0,9994	No Signif.

Comparación genética entre subpoblaciones

La caracterización genética de las subpoblaciones revela que los valores de variabilidad más altos corresponden a las subpoblaciones SalvDE y Cult.3, mientras que los valores más bajos corresponden a las subpoblaciones Cult.1 y Cult.2. Sin embargo, el reducido número de individuos de cada subgrupo impide que estos resultados sean estadísticamente significativos. Los valores de diferenciación genética (F_{st}) entre las subpoblaciones y el grado de significancia se muestran en la siguiente tabla 5. El estudio de los valores de diferenciación genética (F_{st}) entre las subpoblaciones y el grado de significancia (Tabla 5) se revela que los grupos Cult1 y Cult2 representan muestras de la misma población. Por el contrario, los valores de F_{st} para el resto de comparaciones por pares revelaron diferencias significativas. A modo de representación gráfica, se ha llevado a cabo un análisis factorial de la correspondencia (AFC) (figura 1).

Tabla 5. Valores F_{st} (Weir & Cockerham, 1984) entre las distintas subpoblaciones (por encima de la diagonal principal) y grado de significación (por debajo de la diagonal principal). NS; Diferencias No Significativas. * Diferencias significativas.

FST	Cult1	Cult2	Cult3	SalvDE
Cult1		0.024	0.069	0.075
Cult2	NS		0.123	0.127
Cult3	*	*		0.083
SalvDE	*	*	*	

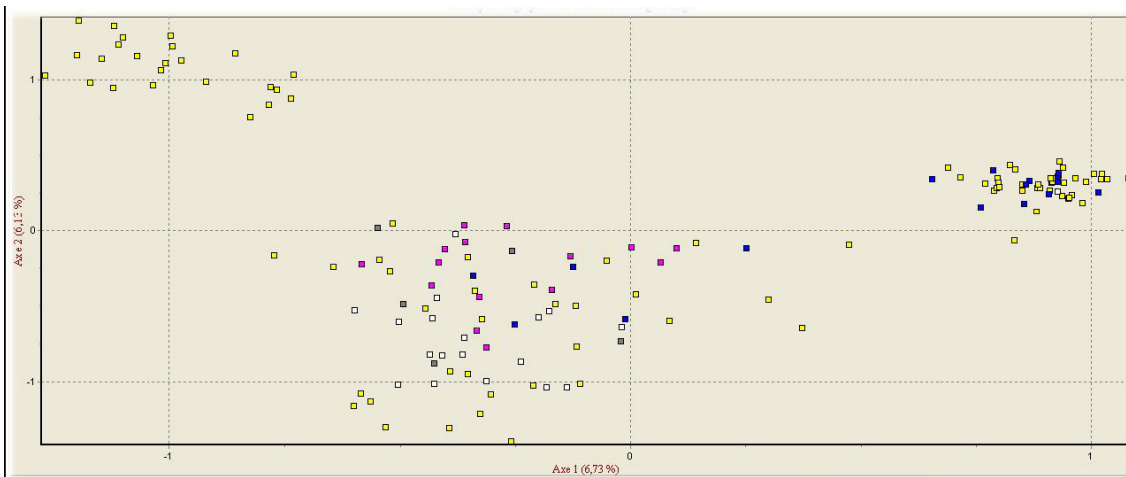


Figura 1. Análisis Factorial de la Correspondencia (AFC) de las distintas subpoblaciones. En amarillo se representan los individuos de la subpoblación Cult.1, en azul Cult.2, en blanco Cult.3 y en rosa la subpoblación SalvDE.

Estimación de los valores de parentescos entre individuos

Los resultados de las estimaciones de parentesco entre los individuos del stock analizado revelan estrechas relaciones de parentesco entre los reproductores. Esto es especialmente relevante en el caso de las subpoblaciones Cult.1 y Cult.2, donde la mayoría de los individuos son hermanos y medios

hermanos. Las similitudes genéticas entre estos dos grupos revelan que estos individuos proceden del cruce entre unos pocos reproductores. Para profundizar más en el estudio del parentesco entre los individuos se ha empleado el estimador estadístico de F&T. Los resultados muestran como el grupo Cultivado1 presenta dos grandes familias de hermanos completos: una Familia 1, formada por 24 individuos y una Familia 2 formada por 33 individuos. Por otro lado, el grupo Cult2 contiene 10 individuos que son hermanos completos y que además lo son también de la Familia 2. Por tanto, estos resultados coinciden con los datos aportados con el estimador de Q&G (Queller y Goodnight 1989). Además de estas grandes familias existen más grupos pequeños que presentan estrechas relaciones de parentesco. Estos parentescos son escasos en el grupo de individuos capturados del medio natural (grupo SalvDE).

Comparación genética de las distintas subpoblaciones con respecto a una población de referencia.

Se observa, de los valores de Fis (Tabla 6), que los grupos salvajes SalvAT de referencia y SalvED presentan valores de variabilidad significativamente mayores al resto de grupos (Tabla 7).

Tabla 6. Diferencias entre las características genéticas de cada una de las subpoblaciones. Número de alelos (K), Número de alelos corregido por el tamaño de la muestra (K')¹, Heterocigosidad observada y esperada (H_o y H_e respectivamente)², Contenido de información polimórfica (PIC), Valores de exclusión 1 y 2 (Excl 1 y Excl 2 respectivamente), grado de conformidad con respecto a las condiciones de equilibrio de Hardy-Weinberg (Fis).

Group	K	K'	H_o	H_e	PIC	Excl 1	Excl 2	Fis
Cult1	13.13	7.83	0.78	0.81	0.78	0.99	0.99	*
Cult2	5.88	5.49	0.73	0.68	0.61	0.92	0.99	*
Cult3	8.88	7.84	0.81	0.80	0.75	0.99	0.99	*
SalvDE	7.88	7.88	0.77	0.80	0.75	0.99	0.99	NS
SalvAt	12.12	10.1	0.83	0.86	0.84	0.99	0.99	NS

El estudio del F-estadística (FST) revela que los grupos SalvAt y SalvED representan muestras de poblaciones genéticamente distintas (Tabla 3).

Tabla 7. Valores Fst (Weir & Cockerham, 1984) entre las distintas poblaciones SalvDE y SalvAt (por encima de la diagonal principal) y grado de significación (por debajo de la diagonal principal). NS; Diferencias No Significativas. * Diferencias significativas.

FST	SalvDE	SalvAt 2
SalvDE		0.032
SalvAt	*	

Agradecimientos: Dr. Javier Porta colaboró en la redacción de la informe de objetivo A4 Obtención de reproductores genéticamente adecuados para el desarrollo de programas de reproducción e cautividad.

2.5.A3. CONCLUSIONES

De los tres grupos de lenguados cautivos (Cult 1, 2 y 3) dos grupos (Cult 1 y2) se presentan una alta prevalencia de hermanos y medio hermanos de dos

familias. Por lo tanto es indispensable hacer un análisis genético de los reproductores potenciales para formar grupos con una heterocigosidad genética adecuada y para evitar endogamia y desequilibrio de la variedad genética de la población.

La genética de la población de lenguados del Delta Ebro es distinta a la genética de la población de lenguados del Atlántico sur. Es posible que la genética de los lenguados del Delta Ebro resulte en un comportamiento o rendimiento diferente en condiciones de cautiverio.

La caracterización genética del stocks salvajes de lenguado indica una diversidad muy elevada.

El estudio del parentesco de la progenie obtenida durante estos tres años, indica que las larvas obtenidas se asignan a parejas únicas y que siguen reproduciéndose año tras año.

2.6.A3. VALORACIÓN

2.7.A3. DIFUSIÓN

Presentación en congreso:

Neil Duncan, Javier Porta, Ignacio Carazo, José Maria Porta, Maria Agulleiro, Joan Cerda 2007. Genetic diversity of Senegalese sole (*Solea senegalensis*) stocks reared in captivity. 8th International Symposium on Reproductive Physiology of Fish. June 3-8 2007, Saint Malo, France.

Publicaciones:

Neil Duncan, Javier Porta, Ignacio Carazo, José Maria Porta, Maria Agulleiro, Joan Cerda, 2008. Genetic diversity of Senegalese sole (*Solea senegalensis*) stocks reared in captivity. CYBIUM International Journal of Ichthyology 32 (2) 336

R. Cal, J. Castro, O. Chereguini, E. Mañanos , A. Pino, M. Olmedo, J.B. Peleteiro , C. Gómez , B. Alvarez-Blazquez., C. Rodríguez, J.M. Guzmán, P. Martínez, 2007. Estructura reproductiva determinada por marcadores microsatélites en stocks de lenguado senegalés (*Solea senegalensis*). Libro de resúmenes de X Foro de los Recursos Marinos y de la Acuicultura en las Rías Gallegas e I Foro Iberoamericano dos Recursos Mariños e da Acuicultura.

2.8.A3. INCIDENCIAS DE DESARROLLO

2.9.A3. BIBLIOGRAFÍA

- Botstein, D., White, R.L., Skolnick, M., Davis, R.W., 1980. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *American Journal of Human Genetics* 32, 314–331.
- Chakravarti A, Li CC (1983) The effect of linkage on paternity calculations. In: *Inclusion Probabilities in Parentage Testing* (ed. Walker RH), pp. 411–422. American Association of Blood Banks, Arlington, Virginia.
- Goodnight, K.F., Queller, D.C., 1999. Computer software for performing likelihood tests of pedigree relationship using genetic markers. *Molecular Ecology* 8, 1231-1234.
- Goudet, J., 2001. FSTAT, a program to estimate and test gene diversities and fixation indices (Version 2.9.3).
- Marshall TC, Slate J, Kruuk LEB, Pemberton JM (1999) Statistical confidence for likelihood-based paternity inference in natural populations. *Molecular Ecology*, 7, 639–655.
- Mousadik, A., Petit, R.J., 1996. High level of genetic differentiation for allelic richness among populations of the argan tree [*Argania spinosa* (L.) Skeels] endemic to Morocco. *Theor. Appl. Genet.* 92, 832-839.
- Queller D, Goodnight KF, 1989. Estimating relatedness using genetic markers. *Evolution.* 43:258-275.
- Weir, B.S., Cockerham, C.C., 1984. Estimating F-statistics for the analysis of population structure. *Evolution* 38, 1358–1370.
- Wright, S., 1969. *Evolution and the genetics of populations. The Theory of Gene Frequencies. Vol. 2.* University of Chicago Press. Chicago.

2.1.A4. OBJETIVO INICIAL A.4

A.4. Determinar diferencias en la calidad del esperma y ovocitos de lenguado, en función del origen de los mismos y las condiciones de cultivo.

2.2.A4. OBJETIVOS REALIZADOS

Caracterización de gametos en función de diferencias en la calidad del esperma y ovocitos, según el origen de los lenguados y las condiciones de cultivo.

2.3.A4. METODOLOGÍA

Esperma:

Durante el primer año del proyecto se realizó la caracterización del esperma, previamente se realizó un ejercicio de intercalibración con investigadores de diferentes centros de las C.A. participantes. Se caracterizó el esperma de ejemplares salvajes del Toruño (Cádiz), así como la capacidad de conservación del esperma y la respuesta de los machos al tratamiento hormonal (LHRAa, Sigma) con el fin de incrementar el volumen del esperma

Huevos

Para determinar la calidad de los ovocitos se han evaluado los siguientes parámetros: el volumen total de la puesta (cc); el volumen flotante y no flotante (cc); la tasa de fecundación y de eclosión (%). Los datos obtenidos de los diferentes stocks se han presentado anteriormente en las Tablas I y II de la Actividad 3. Además, en el IEO de Santander se ha valorado la evolución del diámetro del ovocito según transcurre el periodo de puesta y se han realizado análisis bioquímicos de las puestas para valorar posibles diferencias respecto al origen del ejemplar, salvaje o cultivado, época de puesta y influencia de la alimentación. Los dos primeros años se realizó el análisis bioquímico de los ovocitos procedentes de puestas naturales de ejemplares salvajes y este último año se analizaron los procedentes de primera generación de lenguado cultivado F1.

2.4.A4. RESULTADOS

Esperma:

Los resultados de la caracterización fueron que el volumen medio de esperma era bajo de $83,81 \pm 15,91 \mu\text{L}$, con una densidad media de $1,12 \pm 0,19 \times 10^9$ espermatozoides por mL y una movilidad alta entre un 60-80% de espermatozoides móviles con una duración de la movilidad entre 50-60 segundos. Además, el esperma guardado a 4 °C mostraba una pérdida de la movilidad tras 24 horas; pero el esperma diluido en la solución salina de Ringer 200 mOsmol

mejoraba significativamente su movilidad. Respecto al tratamiento hormonal, a las 48 horas con una dosis de $10 \mu\text{g kg}^{-1}$ se encontró un volumen mayor de esperma que con $5 \mu\text{g kg}^{-1}$, pero la densidad del esperma decrecía después de 96 y 144 horas del tratamiento.

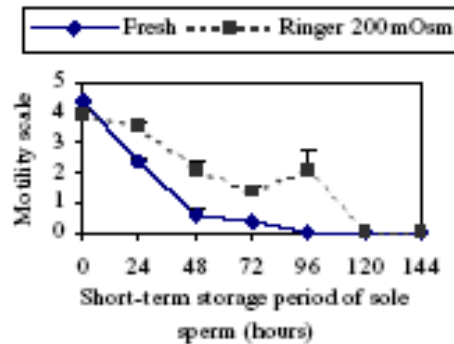


Figura 1. Movilidad media \pm SE del esperma de 21 ejemplares de lenguado guardado a 4° C durante 144 horas.

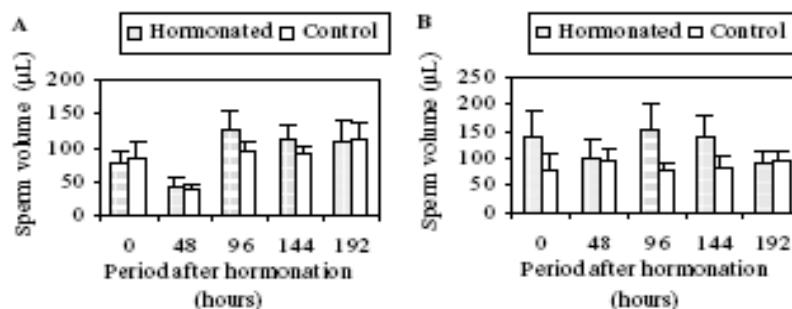


Figura 2. Volumen medio \pm SE de esperma de 21 ejemplares de lenguado hormonados con LHRHa (A: $5 \mu\text{g Kg}^{-1}$; B: $10 \mu\text{g Kg}^{-1}$) frente al control.

Una vez caracterizado el esperma se realizó un estudio para determinar los posibles cambios estacionales de la calidad del esperma de ejemplares salvajes durante la época de reproducción. Este estudio se realizó con ejemplares de dos centros situados en diferente área geográfica El Toruño (N=12, IFAPA Cadiz) y el IEO (N=23, Santander, Cantabria), encontrándose que la calidad y producción eran similares en los dos stocks reproductores. El volumen, densidad y producción del esperma eran mayores en el periodo principal que en el segundo periodo reproductivo (Tabla III). El volumen de esperma aumentaba de $35,65 \mu\text{l}$ en Febrero a $130,83 \mu\text{l}$ en Marzo, y luego decrecía otra vez. La mayor producción de esperma se obtuvo en Junio. La mayor movilidad del esperma ($3,38 \pm 0,47$) se encontró en Marzo con la menor densidad del esperma ($0,75 \pm 0,14 \times 10^9$ espermatozoides por ml).

Tabla III. Cambios estacionales de la calidad del esperma. Los valores medios con diferente letra indican diferencias significativas.

	Volumen (µL)	Produccion (nº esperm. x 10 ⁶)	Volumen / peso macho (µL kg ⁻¹)	Densidad (nº esperm. x 10 ⁹)	Movilidad (escala 0-5)
Febrero	35,65 ± 3,20 ^b	41;24 ± 5,59 ^b	32,33 ± 3,24 ^b	1,12 ± 0,19 ^b	1,41 ± 0,27 ^b
Marzo	130,83 ± 24,51 ^a	85,10 ± 17,16	66,86 ± 9,38 ^a	0,75 ± 0,14 ^b	3,38 ± 0,47 ^a
Junio	62,40 ± 8,21 ^b	175,31 ± 32,59 ^a	54,23 ± 6,65	2,56 ± 0,35 ^a	2,24 ± 0,31
Octubre	67,76 ± 9,49 ^b	79.80 ± 12,96 ^b	53,83 ± 7,43	1,46 ± 0,23 ^b	2,66 ± 0,29 ^a

Posteriormente se realizó un estudio anual más exhaustivo del esperma de ejemplares salvajes y cultivados de primera generación F1 estabulados en dos zonas geográficas diferentes de España (Sur y Norte).

En el IRTA (C.A. Cataluña) también se caracterizó la calidad del esperma de machos de diferente stock y edad de lenguados cultivados estabulados en el centro IRTA: uno procedente del IEO de Santander de 3 años de edad y otro procedente de ABSA, Culmarex, (Mallorca) de huevos obtenidos del Toruño (IFAPA, Cádiz). Se evaluó la calidad de esperma de los dos grupos (3 y 4), en tres fechas; 11 de abril, 9 de mayo y 12 de junio 2006. El volumen de esperma del grupo 4 (cuatro años) fue significativamente más alto (0,11 mL por pez) que el del de grupo 3 (tres años) 0,03 mL por pez, como se observa en Figura 3. No hubo diferencias significativas entre el volumen por fecha de muestreo o por interacción de las dos variables independientes, stock y fecha de muestreo. Tampoco hubo diferencias significativas entre los otros parámetros dependientes: movilidad, tiempo de movilidad y densidad de espermatozoos, por: stock, fecha de muestreo o por interacción de las dos variables.

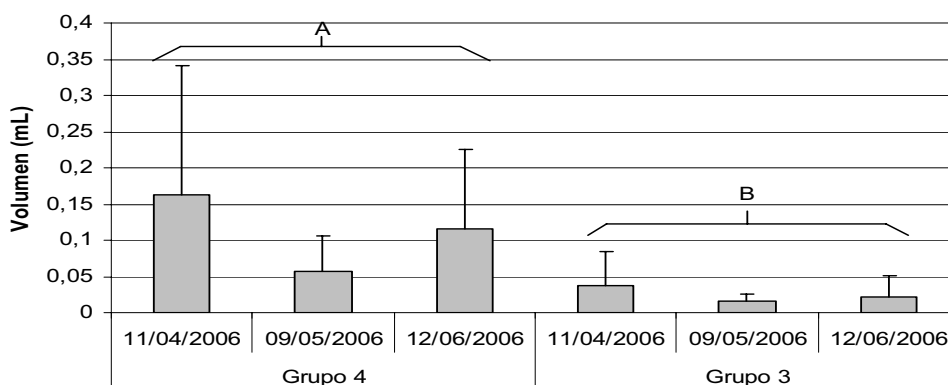


Figura 3. Volumen de esperma para el lenguado Senegalés (*Solea senegalensis*) en dos grupos con edad diferente y 3 fechas de muestreo. Letras diferentes indican diferencias significativas entre grupos.

Los promedios globales obtenidos para los parámetros movilidad, tiempo de movilidad y densidad de espermatozoos fueron 3,7±1,6, 99,3±30,7 segundos, 1,28±1,37x10⁹ espermatozoides mL⁻¹ respectivamente. Un porcentaje del 42% de los machos se presentaron con esperma de buena calidad > 80% de movilidad (índice 5) y un 65% de los machos con una movilidad > 60% (índice 4+5) (Fig. 4).

Se concluyó que los dos grupos de lenguados criados en cautividad (generación F1) tienen la capacidad de fecundar huevos con un 42% de los machos con más de un 80% de movilidad de espermatozoides. Sin embargo, no podemos descartar que una forma de disfunción reproductiva afecte la producción de espermatozoides o que una disfunción reproductiva impida a los machos con espermatozoides de buena calidad, participar en el cortejo y fecundación de los huevos.

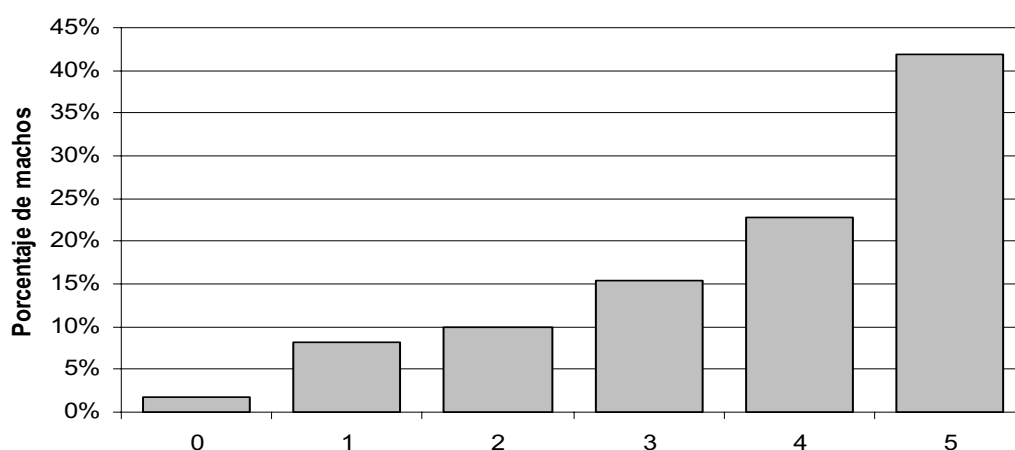


Figura 4. Porcentaje de los lenguados Senegalés (*Solea senegalensis*) de grupos con edades de 3 y 4 con cada índice de movilidad de espermatozoides (escala 0-5).

Además se ha evaluado el efecto de la alimentación (dieta natural frente a comercial) sobre la calidad del espermatozoides de ejemplares cultivados o de primera generación F1 procedentes de dos stocks (IFAPA, Cádiz y IEO Santander) situados en zonas geográficas diferentes. Así como un estudio endocrino de estos ejemplares en función de la dieta suministrada. No se encontraron diferencias en la calidad del espermatozoides entre los dos stocks de F1, pero sí una influencia positiva de una dieta natural sobre la calidad del espermatozoides durante los dos periodos de puesta. Así en primavera y otoño, los parámetros de calidad fueron mayores con alimento natural (Tabla IV). En invierno la producción, densidad y movilidad también eran mejores y en verano solo la movilidad del espermatozoides era superior.

Tabla IV. Valores medios \pm SEM de calidad del espermatozoides de lenguado cultivado (F1) alimentado con diferente dieta (N= natural; C= comercial) durante un ciclo anual. Valores con asterisco eran significativamente diferentes ($p < 0.05$).

	Dieta	Volumen (μ l)	Volumen / peso macho (μ l kg^{-1})	Producción (n° esperm. $\times 10^6 kg^{-1}$)	Densidad (n° esperm $\times 10^9$)	Movilidad (escala 0-5)
Primavera	N	50,8 \pm 3,35*	37,27 \pm 2,84*	62,04 \pm 8,44*	1,62 \pm 0,2*	2,66 \pm 0,18*
	C	36,58 \pm 3,25	28,41 \pm 2,37	17,61 \pm 2,93	0,53 \pm 0,08	1,74 \pm 0,19
Verano	N	39,44 \pm 5,35	28,51 \pm 3,58	24,83 \pm 4,77	0,69 \pm 0,07	2,22 \pm 0,29*
	C	46,67 \pm 10,68	28,7 \pm 5,76	27,9 \pm 7,9	0,94 \pm 0,24	1,17 \pm 0,35
Otoño	N	71,78 \pm 8,29*	55,53 \pm 6,85*	44,46 \pm 7,71*	0,94 \pm 0,15*	2,25 \pm 0,15*
	C	38,82 \pm 5,16	28,23 \pm 3,83	36,78 \pm 15,22	0,87 \pm 0,3	1,33 \pm 0,26
Invierno	N	51,25 \pm 9,04	38,13 \pm 5,94	83,68 \pm 15,71*	2,22 \pm 0,4*	2,28 \pm 0,35*
	C	67 \pm 10,62	51,57 \pm 9,72	25,55 \pm 5,40	0,69 \pm 0,13	1,33 \pm 0,27

Por otro lado, el IEO de Vigo ha realizado un estudio de conservación de esperma a corto plazo a baja temperatura 4 °C utilizando como solución inmovilizante dos diluyentes distintos: Ringer-200 y ASL2, en proporciones progresiva desde 1:1 hasta 1:9 (esperma: diluyente). Los primeros resultados indican que el esperma de lenguado senegalés, puede ser inmovilizado en Ringer-200 y posteriormente (3 o cuatro horas) ser reactivado manteniendo su movilidad, aunque a diferencia de lo que sucede con el rodaballo, más allá de 24 horas disminuye la movilidad de forma acusada. A partir de la dilución 1:5 en ambos diluyentes el grado de movilidad disminuye, y la duración de la movilidad parece ser mayor en ASL2. No se ha obtenido fecundación con el esperma conservado durante 24 h a 4°.

Huevos

Se observa una disminución del diámetro de ovocito según transcurren los meses de puesta hasta el mes de septiembre en que se observa un nuevo incremento coincidiendo con el segundo periodo de puesta dentro del ciclo anual (Fig. 5).

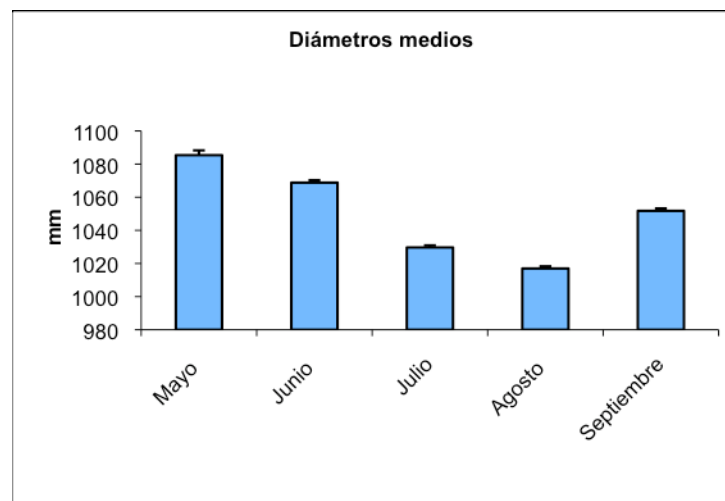


Figura 5. Evolución del diámetro del ovocito de 28 puestas a lo largo del periodo reproductivo (N=100)

Respecto a la composición bioquímica de los ovocitos de salvajes, se encontraron diferencias en el porcentaje de proteínas entre la primavera y verano del 2006; dichas diferencias continuaron al año siguiente pero no seguían la misma tendencia. En el porcentaje de lípidos no se encontraron diferencias estacionales, pero los valores fueron algo superiores en el 2007. El perfil de ácidos grasos sigue la misma tendencia: los ácidos grasos poliinsaturados (PUFA) fueron el principal componente de los lípidos, seguido de los ácidos grasos saturados y monoinsaturados. En el 2006 se encontraron diferencias en las relaciones DHA/EPA Y AA/EPA entre los dos periodos de puesta, siendo superiores en primavera; sin embargo en el 2007 solo se encontró una relación AA/EPA superior también en primavera. En la tabla V se presentan los valores medios de los dos años estudiados, donde el porcentaje de lípidos y proteínas de

ovocitos salvajes eran inferiores a los de la primera generación F1, pero con porcentajes de monoinsaturados, de $\sum w3$, la relación de $\sum w3/w6$ y de AA/EPA superiores a los de la F1 con la misma dieta.

Por otro lado, en la composición bioquímica de los ovocitos de la primera generación de lenguado cultivado F1 se encontraron diferencias significativas en función de la alimentación. El porcentaje de lípidos y proteínas era significativamente superior en los ovocitos alimentados con pienso, así como en el perfil de ácidos grasos el porcentaje de $\sum w6$, y las relaciones DHA/EPA y ARA/EPA, mientras que el porcentaje de saturados, de $\sum w3$ y la relación $\sum w3/w6$ eran superiores en los ovocitos de lenguados con alimento natural. En la tabla V se presentan los valores medios de la composición bioquímica de las ovocitos de ejemplares salvajes y de la F1.

Tabla V. Composición bioquímica de puestas de lenguado senegalés salvajes y cultivado (F1) con diferente tipo de dieta, natural y comercial: composición lipídica (% del total), lípidos y proteínas (%). Los datos son medias \pm SEM y las medias con la letra "a" de superíndice presentan diferencias significativas entre la F1 con diferente tipo de dieta; con * entre salvajes y F1 con la misma dieta y con el número "1" entre salvajes y F1 con dieta comercial.

	Salvaje (Natural) Media \pm SEM	F1 (Natural) Media \pm SEM	F1 (Comercial) Media \pm SEM
Lípidos	15,89 \pm 0,27	18,35 \pm 0,50*	23,75 \pm 1,21 ^{a,1}
Proteínas	33,23 \pm 0,40	36,54 \pm 0,95*	41,02 \pm 0,72 ^{a,1}
PUFAS	48,22 \pm 0,45	47,82 \pm 0,54	48,45 \pm 0,78
Saturados	27,86 \pm 0,34	29,16 \pm 0,33 ^{a*}	27,39 \pm 0,23
Monoinsaturados	23,91 \pm 0,33 [*]	23,02 \pm 0,22	24,16 \pm 0,61
$\sum w3$	44,18 \pm 0,21 ^{*,1}	42,09 \pm 0,52 ^a	37,60 \pm 0,59
$\sum w6$	4,03 \pm 0,46	4,94 \pm 0,07 [*]	10,04 \pm 0,73 ^{a,1}
$\sum w3/w6$	11,06 \pm 0,13 ^{*,1}	8,55 \pm 0,15 ^a	3,92 \pm 0,27
DHA/EPA	5,76 \pm 0,14 [*]	3,90 \pm 0,09	7,14 \pm 0,36 ^{a,1}
AA/EPA	0,56 \pm 0,02 ^{*,1}	0,42 \pm 0,01	0,48 \pm 0,03 ^a

Por otro lado, debido a la falta o escasa fecundación encontrada en las puestas de ejemplares F1 se realizó una experiencia conjunta en las instalaciones del IEO de Santander, a donde se desplazaron investigadores de varios Centros, IATS (Castellón, C. A. Valencia), IEO (Santander, C.A. Cantabria), IEO (Vigo, Galicia) e IFAPA "El Toruño" (Cadiz, C.A. Andalucía), con el objetivo de determinar la viabilidad de los gametos, huevos y esperma, obtenidos de reproductores F1. Se diseñó un protocolo de inducción hormonal y de fecundación artificial mediante la utilización cruzada de gametos obtenidos de reproductores salvajes y F1. Previamente, en el IATS se prepararon los tratamientos hormonales, consistentes en implantes GnRH α ([D-Ala⁶, Pro⁹Net]-LHRH, Bachem), cargados con 50 ug GnRH α /implante, para administrar una dosis final aproximada de 40 ug/kg pez e inyecciones de GnRH α , consistentes en una solución salina de GnRH α aplicada a una dosis final aproximada de 25 ug/kg pez. El tratamiento hormonal se aplicó a hembras en estado de maduración avanzado E3 y a las 48h los huevos fueron obtenidos por masaje abdominal ("stripping") de hembras salvajes y F1. Se fecundaron con esperma también obtenido por masaje

abdominal de machos salvajes y F1 en estado de espermización, realizándose un total de 4 lotes de fecundación artificial. Tras la incubación, se determinó el porcentaje de fecundación obtenido en cada lote y se siguió periódicamente la evolución del desarrollo embrionario, así como la eclosión y desarrollo larvario. Los resultados indican que los gametos de la generación F1 son viables, no se observaron diferencias entre las fecundaciones de huevos procedentes de hembras salvajes y cultivadas, sugiriendo que ambos tipos de huevos son igualmente viables para la fecundación artificial. Además, se observaron fecundaciones similares usando tanto el espermia fresco como el criopreservado, indicando que el protocolo de criopreservación era apropiado para guardar el espermia de lenguado senegalés. Los detalles metodológicos y resultados de la experimentación se presentan en los informes de la Comunidad de Cantabria.

2.5.A4. CONCLUSIONES

La manipulación del termoperiodo induce la reproducción de lenguado senegalés, permitiendo la obtención de puestas naturales. El volumen total de huevos, la fecundidad relativa diaria, número de puestas, tasa de eclosión y la producción de larvas registradas del stock salvaje se ha incrementado a lo largo de estos años.

En el caso del stock cultivado no se han obtenido puestas fecundadas excepto en un caso en el 2007.

La dieta natural produce mejores resultados en la primera generación F1 tanto en machos como en hembras.

El lenguado es una especie oligoespérmica, con buena movilidad y la duración de la movilidad es alrededor de 1 minuto.

La calidad del espermia presenta cambios estacionales.

La calidad del espermia de lenguados cultivados alimentados con dieta natural es mejor que con dieta comercial.

Respecto a la composición bioquímica de los ovocitos de salvajes, se encontraron diferencias en el porcentaje de proteínas entre los dos periodos de la puesta, primavera y verano. El porcentaje de lípidos era semejante y en el perfil de ácidos grasos el principal componente de los lípidos fueron los ácidos grasos poliinsaturados (PUFA), seguido de los ácidos grasos saturados y monoinsaturados.

Se han encontrado diferencias en la composición bioquímica de los ovocitos de lenguado cultivado (F1): el porcentaje de lípidos y proteínas era superior en los ovocitos de lenguado cultivado alimentado con dieta comercial. También se han encontrado diferencias en el perfil de ácidos grasos.

El tratamiento hormonal incrementó el volumen de esperma a las 48 horas pero la densidad decreció.

Los tratamientos combinados de GnRHa + pimozide indican que el sistema dopaminérgico no parece ejercer una acción fuerte sobre la ocurrencia de puestas en hembras, aunque podría estimular la espermiación en machos de lenguado senegalés.

Los gametos de la F1 o de ejemplares salvajes son igualmente viables para la fecundación artificial.

El protocolo de criopreservación de esperma utilizado es apropiado para el lenguado senegalés.

El lenguado responde positivamente a la inducción hormonal a las 48 horas tanto con implante como con inyección, siendo mayor el volumen y el nº de puestas en ejemplares inyectados.

No se han encontrado diferencias en la calidad del esperma crioconservado F1 o salvaje.

2.6.A4. VALORACIÓN

2.7.A4. DIFUSIÓN

O. Chereguini, V. Anguis, J. B. Peleteiro , J.M. Guzmán, 2006 . Sperm quality in Senegal sole *Solea senegalensis* (Kaup 1958): motility and density. Response to hormonal treatments. En: Abstracts del Congreso Europeo de Acuicultura, 9-13 de Mayo, Florencia, Italia.

O. Chereguini, I. Rasines , V. Anguis., R. Cal , I. Martín, C. Rodríguez, J.M. Guzman, C.C Mylonas y E. Mañanós, 2007. Primeras fecundaciones artificiales en lenguado senegalés cultivado (Generación F1). Libro Actas Tomo II del XI Congreso Nacional de Acuicultura 1435-1438.

I. Martín, C. Rodríguez, O. Chereguini, 2007. Puestas naturales de lenguado senegalés, salvajes y cultivados (generación F1), obtenidos por manipulación del termoperiodo en Cantabria. 2007. Libro de Actas Tomo II del XI Congreso Nacional de Acuicultura, 1427-1430.

J.M. Guzmán, A. García-López, M. Olmedo, R. Cal, O, Chereguini, C. Sarasquete ,C.C. Mylonas, J.P. Peleteiro, E. Mañanos, 2007. Estudio preliminar sobre una posible inhibición dopaminérgica en la reproducción del lenguado senegalés (*Solea senegalensis*). Libro Actas Tomo I del XI Congreso Nacional de Acuicultura, 239-242.

I. Rasines, O. Chereguini, C. Rodríguez, F. Linares, G. Pazos, I. Martín 2007. Composición bioquímica de las puestas de lenguado senegalés en

cautividad: variación estacional. Libro Actas Tomo I del XI Congreso Nacional de Acuicultura, 1423-1426.

R.A. Weber, J.B. Peleteiro, O. Chereguini, L.O. García Martín, M. Aldegunde 2007. Evaluación de la eficacia de 2-fenoxietanol como anestésico en lenguado (*Solea senegalensis* Kaup 1858). 2007. Libro Actas Tomo II del XI Congreso Nacional de Acuicultura, 1419-1422.

V. Anguis, O. Chereguini, C. Rodríguez, M. Moure, 2007. Seasonal changes in sperm quality and production of senegal sole *Solea senegalensis* (Kaup 1858) in facilities from northern (Santander) and Southern (cadiz) of Spain. Resúmenes de EAS 24-28 de Octubre, Estambul (Turquia).

V. Anguís, E. Salas-Leiton, I.Martín, O. Chereguini, 2008. Influence of the feeding on sperm quality of first generation (F1) *Solea senegalensis* during an annual cycle in two facilities from Northern (Santander) and Southern (Cádiz) of Spain. Resúmenes Congreso Europeo de Acuicultura del 15-18 de Septiembre 2008, Krakow (Polonia).

2.8.A4. INCIDENCIAS DE DESARROLLO

2.9.A4. BIBLIOGRAFÍA

2.1.A5. OBJETIVO INICIAL A.5

A.5. Desarrollar y aplicar tratamientos hormonales para la estimulación de la espermiación, ovulación y puesta en el lenguado.

2.2.A5. OBJETIVOS REALIZADOS

Diferentes sistemas de inducción hormonal en lenguado para comprobar su efecto sobre la producción de gametos y la puesta.

2.3.A5. METODOLOGÍA

En el momento inicial de constitución del stock de reproductores (julio 2003), se realizó un muestreo general de todos los animales, para su identificación y toma de datos biométricos. El muestreo se realizó sobre animales anestesiados por inmersión en fenoxietanol (0,3 ml/L, Sigma). Se tomaron los datos iniciales de peso y talla, se marcaron individualmente con marcas electrónicas pit-taq (AVID), insertadas en la musculatura dorsal y se les extrajo sangre, para el sexaje de la población mediante análisis plasmático de VTG por ELISA (Mañanos et al., 1994; Guzmán et al., 2008). La población dio un peso de $582,79 \pm 4,41$ g (n=574) y una talla de $33,31 \pm 0,08$ cm (n=574). El análisis de sexaje ELISA dio un 44% de hembras y un 56% de machos. En años posteriores y a medida que los lenguados maduraron en cada ciclo reproductor anual, el sexo de cada individuo se confirmó por observación del desarrollo del ovario y testículo, obteniéndose una concordancia de aproximadamente el 96% entre la determinación realizada por ELISA y la posterior confirmación del sexo. Estos animales se mantuvieron en las instalaciones de Piscimar y del IATS hasta el inicio y durante el presente proyecto, siempre en condiciones naturales de fotoperíodo y temperatura y en las condiciones de cultivo que se detallan a continuación.

En Piscimar se mantuvieron los lenguados en tanques exteriores de 16.000 L de capacidad, circulares de fibra de vidrio y cubiertos con malla para tamizar la incidencia de luz. El fotoperíodo y temperatura fueron naturales, con circuito abierto de agua marina (salinidad 37 ‰) y condiciones de cultivo similares a las del IATS.

En el IATS, el stock de reproductores se mantuvo durante el proyecto en aproximadamente 160 lenguados, repartidos homogéneamente en varios tanques de cultivo. Las bajas se reponían regularmente con nuevos individuos trasladados desde Piscimar, para mantener homogéneo el stock del IATS. Al inicio del proyecto (enero 2006), el stock del IATS lo formaron 180 ejemplares, con un peso de 1.233 ± 68 g, talla de $45 \pm 0,8$ cm y una proporción de sexos alrededor de 1:1. Los reproductores se mantuvieron en 4 tanques de 3.000 L y 4 tanques de 4.000 L de capacidad, de características similares e idénticas condiciones de cultivo. Son tanques circulares de fibra de vidrio, con circuito abierto de agua de mar y flujo de $0,2$ m³/h. Los tanques se localizan en el interior de una nave de cultivo,

expuestos a luz natural y cubiertos con malla oscura para tamizar la incidencia de luz, manteniéndose siempre en condiciones naturales de fotoperíodo y temperatura. Únicamente durante la época de verano (2-3 meses), el suministro de agua se obtuvo por mezcla de agua de pozo (temperatura 18 °C y salinidad 15 ‰) y agua de mar, para amortiguar las elevadas temperaturas estivales y mantener el agua por debajo de los 23 °C (salinidad alrededor de 22 ‰). El mezclado de aguas siempre se hizo de forma gradual durante 1 semana, para evitar estrés osmótico. Los tanques se dotaron con difusores de aireación para mantener la correcta oxigenación del agua. Diariamente se controló en todos los tanques la temperatura del agua, revisándose el estado de salud de los animales e higiene del tanque; dos veces por semana se controló además el oxígeno disuelto y la salinidad.

La alimentación de los reproductores fue natural, consistente en calamar congelado y mejillón fresco troceados, suministrado en una toma (13:00 h) 5 días por semana, de lunes a viernes y ajustando las cantidades a saciedad; sobrantes de comida se eliminaban diariamente de los tanques a la mañana siguiente. Los tanques de reproductores se mantuvieron durante todo el proyecto en densidades entre 2 y 4 kg/m² y una proporción de sexos alrededor del 50%.

A lo largo del proyecto, se realizó un seguimiento continuado del stock de reproductores, para evaluar el crecimiento y estado de salud de los individuos. Durante el primer año (2006) se realizó en el IATS un seguimiento mensual de los reproductores, para determinar el incremento anual de peso y talla. El seguimiento de datos biométricos se continuó en los dos años siguientes, con muestreos más espaciados en el tiempo (aproximadamente cada 3 meses) con el fin de disponer de datos biométricos actualizados para cada época de puesta pero minimizando el posible estrés de manipulación causado a los reproductores.

2.4.A5. RESULTADOS

Experimentos de inducción hormonal sobre machos F1 han mostrado que tanto el tratamiento con implantes GnRHa como con inyección múltiple de gonadotrofina coriónica humana (hCG) estimulan ambos la espermatogénesis y la espermiación. En la figura 6.1 se muestra la producción de esperma en 3 lotes (n=6) de machos reproductores F1, comparando los controles (inyección salino) con un grupo tratado con 2 implantes GnRHa (40 µg/kg, semanas 0-3) y un grupo tratado con inyecciones semanales de hCG (1.000 iu/kg, semanas 0 a 5); las muestras de esperma se recolectaron por masaje abdominal a las 5 semanas después de iniciar los tratamientos.

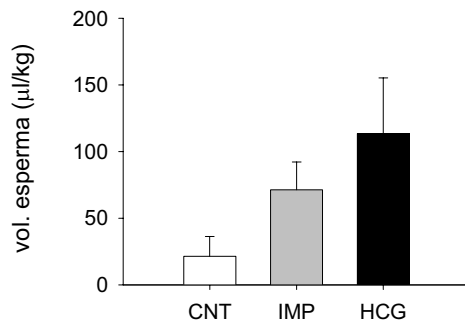


Fig. 6.1. Producción de espermia en machos F1 tratados hormonalmente con: doble implante GnRH_a (IMP) o inyección semanal de hCG (hCG), con respecto a controles no tratados (CNT).

El análisis histológico de muestras de testículo, obtenidas a las 5 semanas de iniciados los tratamientos, mostró estimulación de la espermatogénesis en los machos tratados hormonalmente (fig. 6.2). Los machos control (CNT) muestran lóbulos seminíferos con espermátidas y algunos espermatozoides diferenciados (foto A) y los conductos eferentes medulares con espermatozoides maduros (foto B). Los machos tratados con GnRH_a y hCG muestran, en ambos casos, una mayor proliferación de espermatozoides (fotos C-E), dilatación de los conductos eferentes y mayor acumulación de espermatozoides maduros (foto D-F), con respecto a controles.

En el IATS se realizó una experimentación de inducción hormonal dirigida a comprobar la eficacia de las terapias hormonales que mejores resultados causan en cada sexo y con el fin último de intentar la obtención de puestas fertilizadas en tanques de reproductores F1. El experimento se diseñó para sincronizar la máxima producción de huevos en hembras (1 semana p.t.) con la máxima estimulación de la espermiación en machos (5 semanas p.t.), tratando los machos con anterioridad a las hembras. Se establecieron 5 grupos experimentales, distribuidos en tanques individuales y conteniendo cada uno 6 machos y 6 hembras, tratados de la siguiente forma:

- 1) Hembras y machos no tratados (control).
- 2) Hembras no tratadas y machos tratados con inyección hCG.
- 3) Hembras tratadas con implante GnRH_a y machos no tratados.
- 4) Hembras tratadas con implante GnRH_a y machos tratados con hCG.
- 5) Hembras y machos tratados con implante GnRH_a.

La experiencia se inició con el tratamiento de los machos: inyección de salino (grupo 1, NaCl 0.9%) a semanas 0-2-5, implante GnRH_a (grupo 4, 40 µg kg⁻¹) a semanas 0-2-5 o inyección múltiple de hCG (grupo 5, 1000 iu kg⁻¹) a semanas 0-1-2-3-4-5-6. Dos semanas después de iniciado el tratamiento de los machos, se inició el tratamiento de las hembras, con inyección de salino (grupos 1 y 2) a semanas 2-5 o con implante GnRH_a (grupos 2, 4 y 5, 40 µg kg⁻¹) a semanas 2-5. Se realizó un seguimiento diario de la cantidad y calidad de la puesta de huevos, determinando tasas de flotabilidad y fertilización (fig. 6.3 y tabla 6.1).

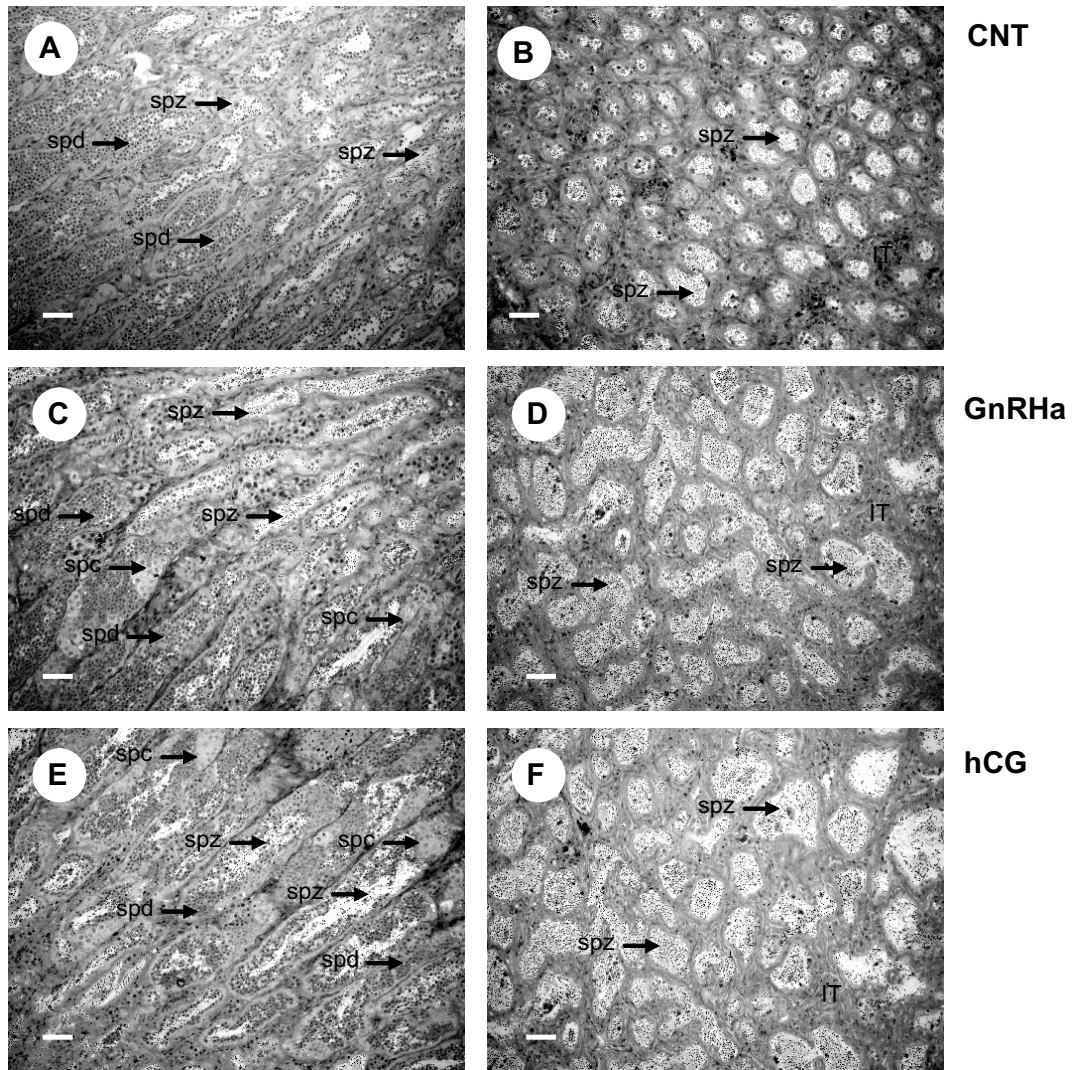


Fig. 6.2. Cortes histológicos de testículo de machos F1, tratados hormonalmente con implantes GnRHa (IMP) o inyecciones hCG (hCG); controles inyectados con salino. Las fotos de la izquierda (A-B-D) corresponden a la zona externa cortical (A, C, E) y las fotos de la derecha a la zona interna medular (B, D, F) del testículo. Abreviaciones: spz, espermatozoide; spd, espermátida; spc, espermátocito; IT, tejido intersticial. Barra de escala: 50µm.

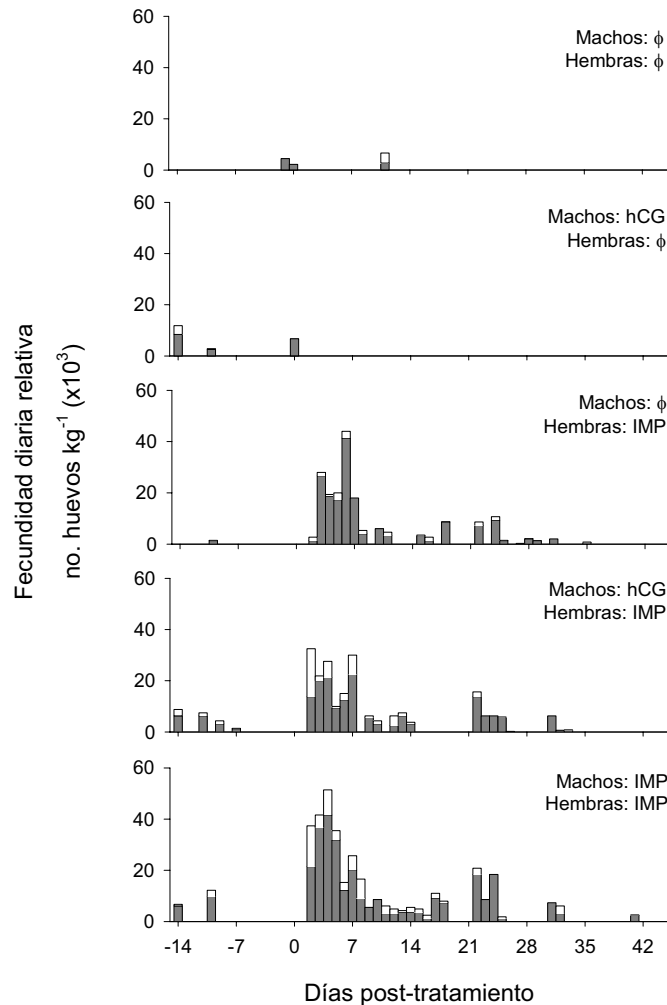


Fig. 6.3. Producción de huevos por inducción hormonal de reproductores F1. Los tratamientos aplicados a los machos y hembras de cada grupo se especifican en cada gráfica. El tratamiento de los machos se inició 2 semanas antes de iniciar el tratamiento de las hembras (día 0). La inducción a la puesta en hembras (implante GnRHa) se realizó los días 0 y 21. Las barras indican la cantidad diaria de huevos hundidos (negro) y flotantes (blanco).

Los grupos conteniendo hembras no tratadas hormonalmente (grupos 1 y 2), produjeron unas pocas puestas esporádicas durante el periodo experimental, de forma similar a lo observado en otros lotes de reproductores F1 del IATS. El perfil de puestas en los grupos 3, 4 y 5, conteniendo hembras tratadas con implantes GnRHa, muestra en todos los casos inducción de puesta de huevos a los 2-3 días p.t., con un comportamiento diario de puesta de 2 semanas. La administración de un segundo implante GnRHa a las 3 semanas induce de nuevo comportamiento diario de puesta, pero con menor intensidad que el obtenido con la primera implantación. Las tasas de flotabilidad de las puestas fueron bajas, pero similares a observaciones previas (tabla 6.1). Las tasas de fertilización fueron nulas, mostrando que el tratamiento previo de los machos no repercutió positivamente en la obtención de puestas fecundadas.

Tabla 6.1. Características de la puesta de huevos de los grupos experimentales de reproductores F1 sometidos a diferentes terapias hormonales.

	♀ ♂	f f	f hCG	Implante f	Implante hCG	Implante Implante
Peso hembras (g)		1.506 ± 108	1.185 ± 138	1.500 ± 122	1.602 ± 78	1.633 ± 92
Nº de puestas		3	3	21	23	26
Fecundidad total (nº huevos)		120.000	127.000	1.438.000	1.831.000	3.016.000
Fecundidad total relativa (huevos kg ⁻¹)		13.300	21.420	191.680	228.850	369.246
Fecundidad diaria relativa (huevos kg ⁻¹)		4.400 ± 1.300	7.142 ± 2.589	9.130 ± 2.420	10.408 ± 1.974	14.202 ± 2.640
% flotabilidad		19,4 ± 19,4	13,4 ± 8,3	12,2 ± 3,3	17,6 ± 3,9	20,5 ± 3,3
% fertilización		0	0	0	0	0

Datos expresados como media ± SEM

La experimentación no pudo considerarse exitosa, por la ausencia de puestas fertilizadas. No obstante, un resultado a considerar fue la diferente producción de huevos en los grupos 3, 4 y 5, en que las hembras fueron tratadas de igual forma (implante GnRH α). Este resultado indicaría que el tratamiento de los machos afecta la fecundidad de las hembras de la población. La fecundidad de las hembras que compartían tanque con machos tratados con hCG (grupo 4) fue superior a la de las hembras que compartían tanque con machos no tratados (grupo 3), llegando a duplicarse en el caso del grupo 5 (fig. 6.4).

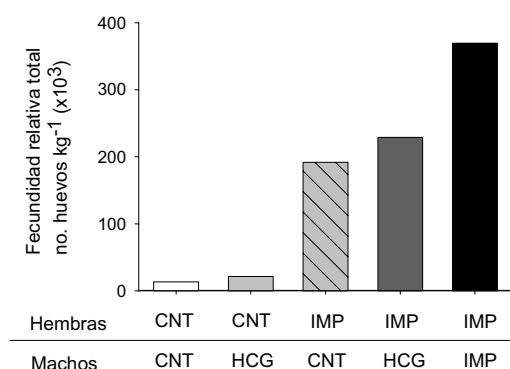


Fig. 6.4. Fecundidad comparativa entre los grupos de reproductores F1 sometidos a tratamiento hormonal (ver fig. 14 y tabla 6). Los tratamientos aplicados a cada grupo se especifican en el eje x.

El incremento de fecundidad de las hembras según el tratamiento hormonal de los machos indicaría una “comunicación” entre los individuos de distinto sexo de la población, probablemente a través de feromonas; en esta experimentación, el sistema de comunicación feromonal estaría estimulado por los tratamientos aplicados a los machos.

En un experimento coordinado entre los Centros de Valencia (IATS), Galicia (IEO Vigo) y Cantabria (IEO Santander), se probó la eficacia de nuevos fármacos en las terapias hormonales de inducción a la puesta, con el fin último de conseguir la obtención de puestas fertilizadas en tanques de reproductores F1. En algunas especies de peces se ha demostrado que la administración de fármacos anti-dopaminérgicos (i.e., pimozide) bloquea la acción de la dopamina, un neurotransmisor que inhibe la maduración gonadal y pautas de comportamiento sexual, afectando negativamente la sincronización de los reproductores y la fecundación de los huevos. En esta experimentación se pretendió determinar si el tratamiento de reproductores F1 con pimozide sería eficaz en estimular la maduración gonadal y liberación de gametos, por sí solo o potenciando el efecto de los tratamientos con GnRH α . La experimentación se realizó al inicio de la época de puesta, comprobando que las hembras se encontraban en fase de maduración avanzada. Se utilizaron 8 tanques, en los que se distribuyeron 4 grupos experimentales por duplicado (6 machos y 6 hembras), tratados de la siguiente forma:

- Grupo CTR: controles tratados con inyección de solución salina (día 0).
- Grupo PIM: tratados con 3 inyecciones de pimozide (1 mg/kg), a días 0-10-24.
- Grupo GnRH α : tratados con implante GnRH α (40 ug/kg) a día 0.
- Grupo combinado: tratados simultáneamente con inyecciones de pimozide (días 0-10-24) e implante GnRH α (día 0).

Sobre uno de los dos duplicados se tomaron muestras de sangre a días 0, 10 y 25, para el análisis por ELISA de esteroides sexuales y muestras de esperma a días 0 y 25, para determinar volumen e índices de calidad (motilidad y densidad). A día 25 p.t. se sacrificaron los animales y se obtuvieron muestras de gónada para análisis histológico. Diariamente se determinó la cantidad y calidad (tasas de flotabilidad y fertilización) de las puestas. El IEO de Vigo se encargó del mantenimiento de los reproductores y análisis de puestas, el IEO de Santander del muestreo y análisis de las muestras de esperma y el IATS de los tratamientos hormonales y análisis de muestras sanguíneas e histológicas.

El análisis de los niveles plasmáticos de andrógenos (testosterona y 11-ketotestosterona) en machos y estrógenos (estradiol) en hembras, no mostró diferencias significativas entre grupos en los momentos de muestreo. Por el contrario, el análisis histológico de las gónadas mostró diferencias importantes entre grupos (tablas 6.2 y 6.3). Las hembras control mostraron en su mayoría una maduración ovárica poco avanzada, observándose en el ovario una mayoría de oocitos (50%) en estado de post-vitelogénesis. Las hembras tratadas con pimozide presentaron ovarios similares a los controles, salvo dos casos que mostraron algunos oocitos en maduración inicial. Las hembras tratadas con GnRH α mostraron una alta variabilidad individual, observándose ovarios conteniendo únicamente oocitos vitelogénicos y otros con oocitos en fases avanzadas de maduración. Las hembras del grupo combinado mostraron ovarios similares al grupo GnRH α , pero con estadios de desarrollo más avanzados. En general, los resultados indicarían que el tratamiento con pimozide estimuló

ligeramente la maduración ovárica y potenciaría el efecto estimulador del tratamiento con GnRHa.

Tabla 6.2. Proporción de hembras en cada tratamiento experimental, agrupadas en función del estado más avanzado del desarrollo oocitario.

	Estado más avanzado de desarrollo oocitario (% individuos)			
	Vitelogénesis		Maduración	
	Inicial	Avanzada	Inicial	Avanzada
CNT	0	100	0	0
PIM	17	50	33	40
GnRHa	20	20	0	60
COMB	0	20	40	0

El análisis histológico del testículo mostró un nº reducido de espermatidas y espermatozoides en los machos control, con predominancia de espermatidas sobre espermatozoides en la corteza testicular y un sistema de conductos eferentes medulares poco desarrollado. El grupo tratado con pimozide presentó un desarrollo testicular algo más avanzado que los controles, con mayor nº de espermatozoides y espermatidas y mayor desarrollo del sistema de conductos eferentes, aunque el nº de espermatozoides en la corteza fue igualmente bajo. Los machos tratados con GnRHa presentaron alta variación individual, pero mostrando en general un grado de maduración avanzada. Los machos del grupo combinado mostraron el mayor nivel de maduración, con un elevado nº de espermatozoides y un sistema de conductos eferentes muy desarrollado. En conjunto y de forma similar a lo observado en hembras, el análisis histológico indicaría que el pimozide estimuló el desarrollo y maduración testicular, potenciando además la acción estimuladora del GnRHa.

Tabla 6.3. Proporción de machos en cada tratamiento experimental, agrupados en función del estado más avanzado del desarrollo testicular.

	Estado más avanzado de desarrollo testicular (% individuos)		
	Espermatogénesis avanzada	Maduración funcional	Recuperación
CNT	83	17	0
PIM	83	17	0
GnRHa	50	50	0
COMB	0	83	17

En relación con la producción de gametos, todos los tratamientos hormonales estimularon la producción de esperma con respecto a controles, principalmente el tratamiento combinado (fig. 6.5); sin embargo, se observó una disminución de la densidad espermática, por lo que el aumento de volumen no se correspondería con un incremento significativo de la producción total de espermatozoides.

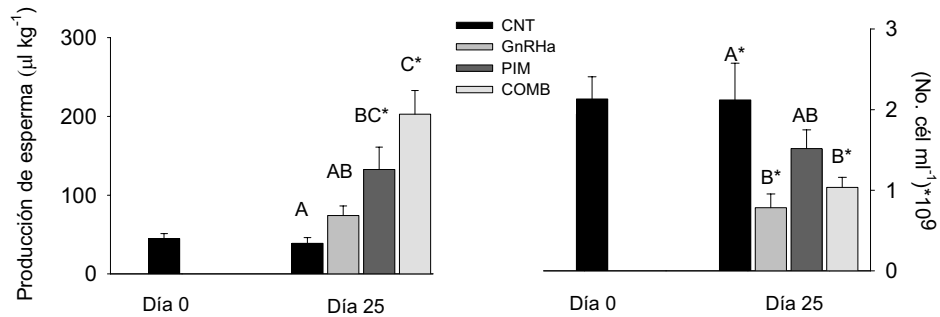


Fig. 6.5. Volumen (µl/kg, grafica izquierda) y densidad (nº espermatozoides/ml (x10⁹), grafica derecha) espermática en machos F1 tratados con: GnRHa (GnRHa), pimozide (PIM) ó tratamiento combinado pimozide y GnRHa (COMB); control inyectado con salino (CNT). El pimozide se administró en inyección (días 0-10-24, dosis 1 mg/kg) y el GnRHa se administró como implante (40 ug/kg) a día 0. Datos expresados como media ± sem.

En relación a la puesta de huevos en los tanques experimentales, se observó inducción de comportamiento diario de puesta a partir de los 3 días p.t. en los dos grupos tratados con implante GnRHa, pero no en los controles o tratados con pimozide (fig. 6.6). No se observaron diferencias en el comportamiento de puesta exhibido entre los grupos tratados sólo con GnRHa o con el tratamiento combinado.

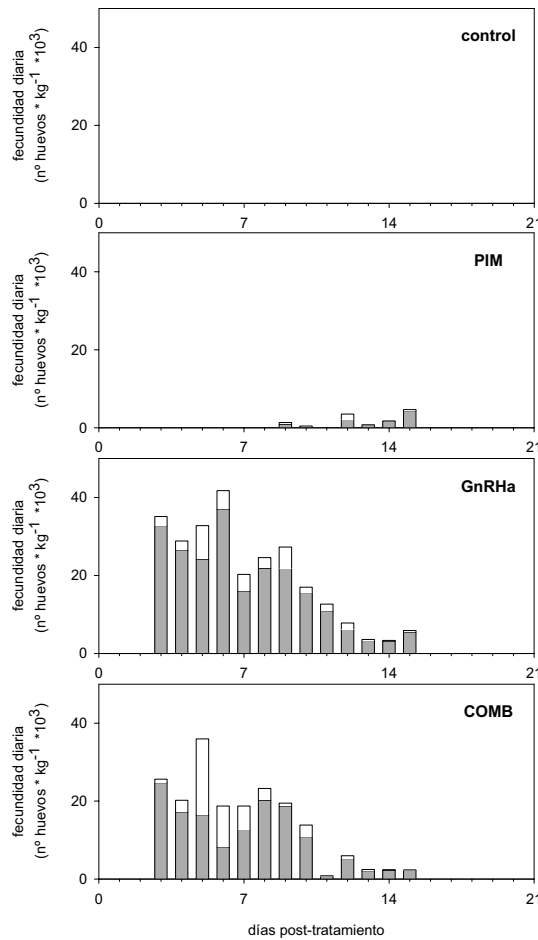


Fig. 6.6. Producción de huevos en lotes de lenguado F1 tratados hormonalmente con: pimozide (PIM), GnRHa (GnRHa) ó tratamiento combinado de pimozide y GnRHa (COMB); controles inyectados con salino. El pimozide se administró en 3 inyecciones (días 0-10-24) a dosis de 1 mg/kg. El GnRHa se administró como implante (40 ug/kg) en 1 aplicación (día 0). Las barras indican la cantidad diaria de huevos hundidos (gris) y flotantes (blanco).

La calidad de puestas en cuanto a tasas de flotabilidad fueron similares entre grupos. El resultado negativo de la experimentación fue de nuevo y de forma similar a lo observado en experimentaciones previas, la ausencia de fertilización en todas las puestas obtenidas. Esto indica que la aplicación de fármacos antidopaminérgicos a los machos y hembras de la población no tuvo efectos positivos sobre la obtención de puestas fecundadas en reproductores F1 y no mejoraría por tanto la eficacia de las terapias GnRHa.

Además de las experimentaciones descritas de estimulación hormonal de la espermiación y puesta de huevos, se han realizado en el IEO de Vigo e IEO de Santander varios experimentos de fecundación artificial, en los que se probaron tratamientos hormonales GnRHa para inducir la ovulación en hembras F1 y obtener huevos por masaje abdominal (“stripping”). Los resultados de fecundación artificial se ofrecen en la actividad A-5; aquí se muestran a continuación los

resultados relativos a la inducción de ovulación en hembras F1 mediante diversos tratamientos hormonales.

Experimento 1. En el IEO de Vigo se realizó una primera experimentación dirigida a probar la eficacia comparativa de inyección e implantes GnRHa sobre la inducción de la ovulación y obtención de huevos por masaje abdominal en hembras F1. Se utilizaron hembras F1 de 1700 g de peso medio, estabuladas en tanques de 2x2x1 m, a temperatura ambiente (sin inducción térmica) y en estadio de maduración sexual III. Los tratamientos hormonales aplicados fueron: 1) inyección GnRHa (d-Ala6, Pro9 Net-LHRHa, 25 µg/kg), 2) implante GnRHa (50 µg/kg) y 3) controles inyectados con suero fisiológico (0,15 ml/kg). Se realizaron 2 series de tratamientos. En la primera serie se establecieron tres grupos experimentales de 4 hembras cada uno, que recibieron los siguientes tratamientos: 1) salino, 2) implante GnRHa, y 3) inyección GnRHa. A los 10 días se repitió el tratamiento a las hembras que habían sido tratadas con salino y con inyección. Tras los tratamientos, las hembras se presionaron suavemente cada 24 h para la obtención de huevos y se determinó el volumen obtenido, así como la calidad de los huevos mediante observación al binocular.

Tabla 6.4. Volumen de huevos obtenido de hembras F1 tras la primera, y segunda inducción del experimento 1

Tratamiento	Momento del masaje tras la inducción		
	24 h	48 h	72 h
1ª inducción			
Control (n=4)	0-<5cc	0-<5cc	0
IMP (n=4)	0	(0-60cc)	(0-100cc)
INJ (n=4)	(0-<5cc)	(0-140 cc)	(0-50 cc)
2ª inducción			
Control (n=4)	0	0	0
IMP (n=4)	0	0	0
INJ (n=4)	0	(0-60cc)	(0-25 cc)

Respecto a las hembras del control, en ningún caso se pudieron obtener huevos por masaje abdominal, aunque presentaban un claro abultamiento abdominal asociado al estado de maduración gonadal. En la primera inducción, se observó un claro efecto del implante GnRHa en aumentar el grado de abultamiento abdominal de las hembras a las 24 h p.t., en comparación con las control; sin embargo, sólo se pudo obtener un volumen importante de huevos por masaje en una de las cuatro hembras tratadas con implante GnRHa a las 48 y a las 72 h p.t. En cuanto al tratamiento con inyección GnRHa, este fue eficaz en inducir la ovulación y posibilitar la obtención de huevos viables en tres de las cuatro hembras tratadas a las 48 y a las 72 h tanto tras la 1ª como en la 2ª inducción.

Experimento 2. El segundo experimento fue realizado con dos grupos de hembras, un grupo (n=2) inyectado con salino y otro grupo (n=8) tratado con inyección GnRHa (25 µg/kg). En ambos grupos se repitió el tratamiento a los 10

días. Como en el primer experimento, tras los tratamientos las hembras se presionaron suavemente a las 48, 72 y 96 h para la obtención de huevos, y se determinó el volumen obtenido así como la calidad de los huevos mediante observación al binocular.

Tabla 6.5. Volumen de huevos obtenido de hembras F1 tras la primera, segunda y tercera inducción del experimento 2.

Tratamiento	Momento del masaje tras la inducción		
	48 h	72 h	96 h
1ª inducción			
Control (n=2)	0	0	0
INJ (n=8)	(50-190)cc	(10-50)cc	(0-80)cc
2ª inducción			
Control (n=2)	0	0	0
INJ (n=7)	(30-150) cc	(30-100) cc	(0-25)cc
3ª inducción			
Control (n=2)	0	0	0
INJ (n= 5)	(10-100) cc	(0-5)cc	0

Como en el primer experimento, en ningún caso se pudieron obtener huevos por masaje abdominal de hembras F1 no tratadas hormonalmente (controles), aunque también en este presentaban un claro abultamiento abdominal asociado al estado de maduración gonadal. En las tres inducciones realizadas, espaciadas en 1 semana, se observó que el tratamiento por inyección GnRHa indujo ovulación y posibilidad de obtener volúmenes importantes de huevos viables en la mayoría de hembras tratadas a las 48 y 72 h p.t..

En el IEO de Santander se realizó una experimentación dirigida a comparar la producción y calidad de ovocitos obtenidos por masaje abdominal en hembras F1 sometidas a diferentes tratamientos hormonales. Se utilizaron doce hembras F1 en estado de maduración III (Anguis y Cañavate, 2007), estabuladas en 3 tanques de 4 m² y sometidas a los siguientes tratamientos: 1) implante GnRHa (50µg.kg⁻¹), 2) inyección semanal de GnRHa (25 µg kg⁻¹) y 3) control inyectados con solución salina (0.15 ml kg⁻¹). Diariamente se muestrearon las hembras hasta obtener la primera puesta y posteriormente cada dos o tres días según el grado de hinchazón abdominal externo, durante 30 días. Se determinó el volumen de las puestas obtenidas por masaje abdominal de cada hembra. Los huevos obtenidos se utilizaron en experiencias de fecundación artificial (ver actividad A-3).

Todas las hembras inyectadas con GnRHa respondieron a las 48 h de cada inyección (fig. 6.12). Tres de ellas (D3, 88 y 1C) respondieron con cantidades mayores a 50 cc a las dos primeras inyecciones mientras que la respuesta a la tercera inyección fue muy inferior. La hembra que respondió a la primera inyección con producciones pequeñas (hembra nº 60), si produjo mayores cantidades en las tres siguientes. En algunos casos se pudieron conseguir dos puestas importantes después de cada inyección (fig. 6.7).

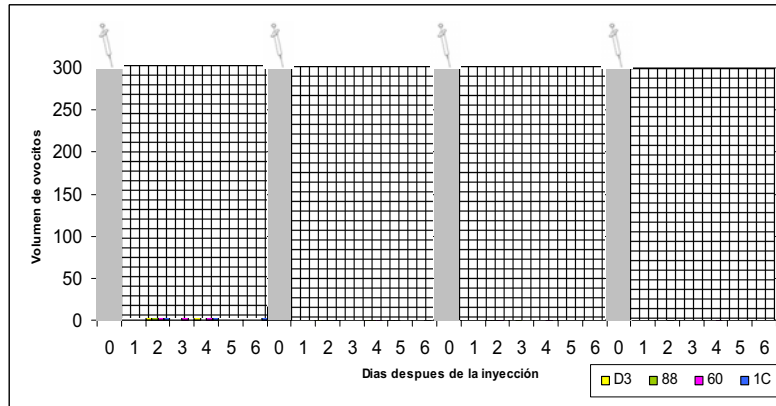


Figura 6.7. Secuencia y volumen de huevos obtenidos por masaje abdominal en hembras inyectadas con GnRH α . Los colores y el código representan la identificación de las hembras.

El tratamiento con implantes solo produjo puestas mayores de 50 cc en dos hembras y en este caso solo hubo una respuesta a las 48 h del tratamiento. De las 4 hembras control una produjo una puesta importante. El volumen por kg de hembra y el nº de puestas por hembra fue significativamente mayor en los ejemplares inyectados ($p= 0,001$ y $p= 0,003$, respectivamente) que en los implantados y control (tabla 6.6).

Tabla 6.6. Características de las puestas obtenidas por masaje abdominal de las hembras F1, control o tratadas hormonalmente con inyección e implante GnRH α . Datos expresados como media \pm STD. Superíndices indican diferencias significativas entre grupos.

Tratamiento	Nº puestas	Nº puestas > 50cc	Vol /♀ (cc)	Vol (cc)/kg ♀	Nº ovocitos/♀
inyección	6,5 \pm 2,5 ^a	3,5 \pm 1,73	572 \pm 317	327 \pm 105 ^a	848683 \pm 414956
implante	2,3 \pm 1,3	0,5 \pm 0,58	91 \pm 68	68 \pm 69	122393 \pm 97379
control	0,8 \pm 1,0	0,25 \pm 0,5	52 \pm 99	29 \pm 53	69906 \pm 132452

2.5.A5. CONCLUSIONES

Experimentos realizados sobre hembras F1 han mostrado que el tratamiento con análogos GnRH (GnRH α) induce la puesta de huevos en el tanque, con una eficacia que depende del modo de administración. El tratamiento por inyección intramuscular (dosis 10-25 ug/kg) produce un efecto agudo e induce puesta de huevos a las 24-48 h post-tratamiento (p.t.), pero únicamente en hembras en estado de maduración ovárica avanzado, resultando ineficaz en hembras en estados tempranos de maduración. La administración de GnRH α mediante sistemas de liberación lenta (implantes o microsferas), produce un efecto sostenido en el tiempo e induce puesta de huevos a partir de los 2-4 días p.t., pero en éste caso con la producción de múltiples puestas diarias durante 2-3 semanas. Los sistemas de liberación lenta son eficaces en hembras con un

menor grado de maduración gonadal y provocan además un mayor número de puestas y mayor producción de huevos que el obtenido por inyección simple.

Estos resultados indican que la inyección GnRH α sería óptima para inducir la liberación rápida de puesta de huevos en hembras en maduración avanzada, mientras que los implantes serían óptimos para obtener mayor nº de puestas y mayor producción de huevos, con más flexibilidad en cuanto al estado de maduración de las hembras tratadas. Entre los sistemas de liberación lenta, los implantes son más económicos, fáciles de manejar y de mayor efectividad que las microsferas, por lo que sería la terapia de elección para hembras F1. A pesar de su eficacia en inducir la liberación de huevos en el tanque, los tratamientos hormonales no han resultado exitosos en la obtención de puestas fertilizadas en el tanque a partir de reproductores F1. Aunque los índices de calidad parecen correctos, en cuanto a tasas de flotabilidad (10-60%) y morfología de los huevos flotantes observada al binocular, se observa en todas las puestas inducidas ausencia de fertilización y tasas de eclosión nulas.

2.6.A5. VALORACIÓN

2.7.A5. DIFUSIÓN

2.8.A5. INCIDENCIAS DE DESARROLLO

2.9.A5. BIBLIOGRAFÍA

2.1.A6. OBJETIVO INICIAL A.6

A.6. Utilizar ciclos de luz y temperatura artificiales para la inducción, sincronización y desplazamiento de la época de puesta del lenguado.

2.2.A6. OBJETIVOS REALIZADOS

Experimentos de manipulación del fotoperiodo y la temperatura del agua.

2.3.A6. METODOLOGÍA

En el IATS se desarrolló una experimentación de manipulación del fotoperiodo en reproductores de lenguado F1. Se utilizaron reproductores de 5+ años de edad, distribuidos en tanques circulares de 3.000 L de capacidad. Los tanques disponían de una cubierta construida en fibra de vidrio de color negro, con una ventana corrediza para la observación, limpieza y alimentación de los reproductores. Las cubiertas disponían de tubos fluorescentes de 8 wat, herméticos a la humedad, que producen una intensidad luminosa de 250 lux en el centro y de 10 lux en zonas próximas a las paredes internas del tanque. El encendido y apagado de los mismos se realiza mediante relojes horarios automáticos.

Se establecieron dos grupos experimentales, por duplicado; un grupo control (tanques A-34 y A-44) sometido a fotoperíodo natural y un grupo manipulado (tanques A-35 y A-45) sometido a fotoperíodo corto constante (9 horas luz: 15 horas oscuridad; condiciones de solsticio de invierno). La manipulación fotoperiódica se inició a partir del solsticio de invierno (21 diciembre) y se mantuvo durante un año. Diariamente se evaluó la cantidad y calidad de puestas.

2.4.A6. RESULTADOS

En el IEO de Santander, desde el año 2003, se han obtenido puestas naturales de ejemplares salvajes adaptados a la cautividad mediante la manipulación del termoperiodo a finales de enero. La manipulación se realiza incrementando la temperatura del agua de mar 0,5 °C semanales, y cuando se alcanzaron los 16 °C se comienza a realizar fluctuaciones incrementando y decreciendo 2 °C cada dos o tres días, a fin de imitar las fluctuaciones naturales registradas en el Toruño (IFAPA) que inducen la obtención de puestas naturales. Cuando la temperatura ambiental del agua de mar es igual a la del circuito cerrado, a mediados o finales de junio, se deja de manipular el termoperiodo. Posteriormente, las puestas naturales obtenidas durante el verano y otoño se obtienen por las fluctuaciones naturales de la zona, influidas principalmente por el viento.

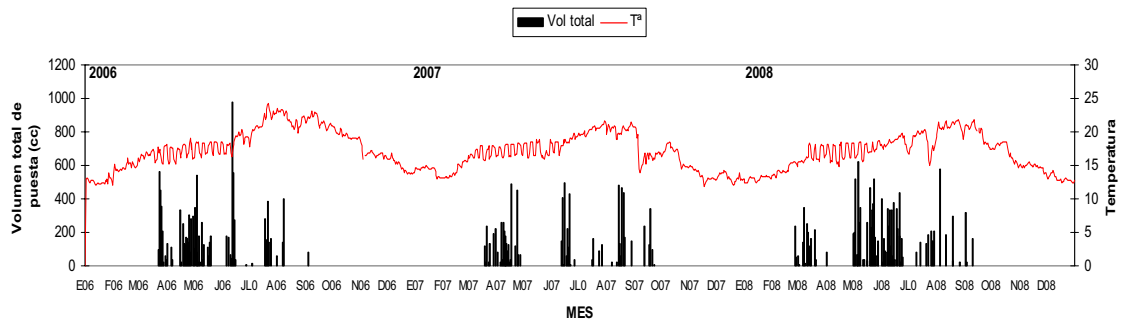


Fig. 7.1. Puesta de huevos en el stock de reproductores salvajes del IEO de Santander (barras). Se muestra las fluctuaciones del termoperíodo (línea).

En el IATS (Comunidad Valenciana) se desarrolló una experimentación de manipulación del fotoperíodo en reproductores de lenguado F1, dirigida a estudiar la posible existencia de ritmos endógenos de reproducción en el lenguado senegalés y determinar como afecta la manipulación del fotoperíodo al comportamiento de puesta de esta especie. Se utilizaron reproductores de 5+ años de edad, distribuidos en tanques circulares de 3.000 L de capacidad. Los tanques disponían de una cubierta construida en fibra de vidrio de color negro, con una ventana corrediza para la observación, limpieza y alimentación de los reproductores y equipada con tubos fluorescentes de 8 wat, herméticos a la humedad, que suministraban una intensidad luminosa de 250 lux en el centro y de 10 lux en zonas próximas a las paredes internas del tanque. El encendido y apagado de luces se realizó mediante relojes horarios automáticos. Se establecieron dos grupos experimentales, por duplicado, un grupo control (tanques A-34 y A-44) sometido a fotoperíodo natural y un grupo manipulado (tanques A-35 y A-45) sometido a fotoperíodo corto constante (9 horas luz: 15 horas oscuridad; condiciones de solsticio de invierno). La manipulación fotoperiódica se inició a partir del solsticio de invierno (21 diciembre) y se mantuvo durante un año. Diariamente se evaluó la cantidad y calidad de puestas (fig. 7.2 y tabla 7.1).

En todos los tanques, tanto los sometidos a fotoperíodo constante como los mantenidos en fotoperíodo natural, se registraron puestas espontáneas (fig. 7.2). Las características de puesta fueron similares a las observadas en otros tanques de reproductores F1 de las instalaciones del IATS (ver actividad A-5), mantenidos en condiciones naturales de fotoperíodo. No se observaron diferencias en las características de puesta de los 4 tanques experimentales, en términos de inicio y fin del período de puestas, nº de puestas y fecundidad de las hembras (tabla 7.1). Las tasas de flotabilidad de las puestas fueron bajas, aunque similares a lo observado previamente en reproductores F1. La tasa de fertilización fue nula, como se detecta habitualmente en los lotes de reproductores F1.

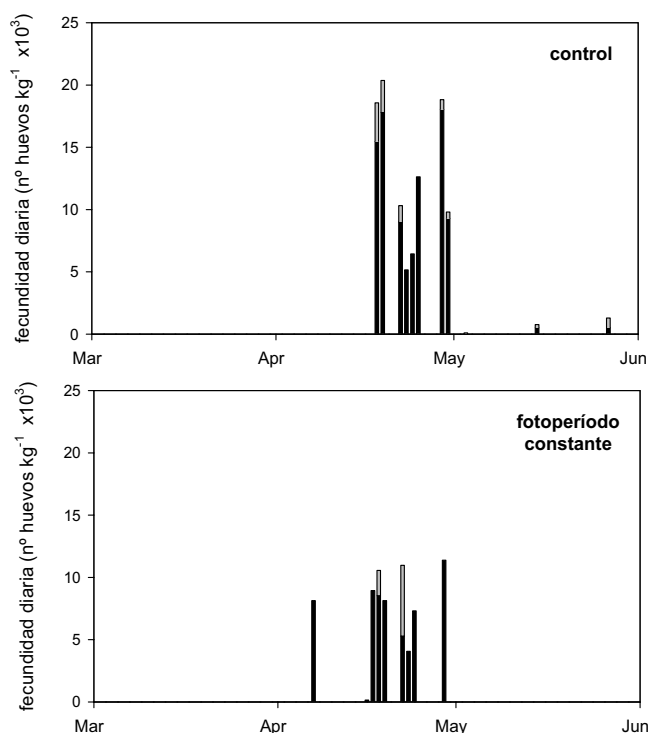


Fig. 7.2. Producción de huevos en los grupos de reproductores F1 mantenidos en fotoperíodo natural (control) o sometidos a fotoperíodo corto constante. Las barras indican la cantidad diaria de huevos hundidos (negro) y flotantes (gris).

Tabla 7.1. Características de la puesta de huevos en los grupos mantenidos en fotoperíodo natural (tanques A-34 y A-44) o sometidos a fotoperíodo corto constante (A-35 y A-45).

	A-34	A-44	A-35	A-45
Nº hembras	4	6	4	3
Nº machos	5	6	3	3
Peso hembras (kg) ¹	2,1 ± 0,2	1,8 ± 0,1	1,7 ± 0,2	1,9 ± 0,2
Peso machos (kg) ⁽¹⁾	1,1 ± 0,1	1,4 ± 0,1	1,3 ± 0,2	1,4 ± 0,3
Densidad (kg m ⁻²)	3.4	3.9	2.5	2.4
Día 1ª puesta	18 abril	18 abril	7 abril	17 abril
Día última puesta	3 mayo	27 abril	29 abril	24 abril
Nº de puestas	8	9	7	3
Fecundidad total (nº huevos)	915.000	1.025.000	765.000	215.000
%huevos flotantes ¹	0,7 ± 0,7	18,1 ± 6,7	12,1 ± 9,1	17,3 ± 17,3
Fecundidad total (huevos/kg)	106.900	94.600	112.500	38.400
Fecundidad diaria ⁽¹⁾	13.400 ± 2.600	10.500 ± 4.300	16.100 ± 3.300	12.800 ± 4.100
Fecundidad diaria máxima ⁽²⁾	24.500 (29 abril)	42.900 (19 abril)	30.700 (16 abril)	16.500 (22 abril)

¹Datos expresados como media ± SEM.

²Muestra el valor máximo de fecundidad diaria observado en el tanque. Entre paréntesis se especifica el día en que se detectó.

2.5.A6. CONCLUSIONES

La ocurrencia de puestas en los tanques sometidos a fotoperíodo constante, es decir, en ausencia de una señal lumínica fluctuante, indicarían la existencia de un ritmo endógeno de reproducción en el lenguado senegalés, que se expresa en ausencia de fluctuaciones del fotoperíodo. Esta experimentación demuestra que el ritmo endógeno se expresa al menos durante un año después de modificar su fotoperíodo natural; este resultado ha de comprobarse en años siguientes, mediante la constatación de expresión del ritmo endógeno de reproducción en ciclos reproductivos sucesivos.

2.6.A6. VALORACIÓN

2.7.A6. DIFUSIÓN

2.8.A6. INCIDENCIAS DE DESARROLLO

2.9.A6. BIBLIOGRAFÍA

2.1.B1. OBJETIVO INICIAL B.1

B.1. Caracterizar estirpes bacterianas en lenguados sanos y enfermos registradas en diferentes centros de investigación.

2.2.B1. OBJETIVOS REALIZADOS

Identificación de estirpes bacterianas presentes en lenguados sanos y enfermos

2.3.B1. METODOLOGÍA

Se muestrearon varios lotes de 30 lenguados y se preservaron los aislados bacterianos para su posterior caracterización. Se cuenta con más de 300 aislados provenientes de lenguados sanos y con aproximadamente 25 aislados provenientes de lenguados enfermos. Los lotes fueron uno del IEO-Santander, uno del IRTA-Sant Carles de la Rápita y dos del IFAPA-El Toruño.

Los diferentes aislados fueron caracterizados con pruebas bioquímicas, moleculares y se caracterizó su perfil de antibioresistencia a 18 antibióticos. Cuando no se identificó la especie bacteriana, se secuenció el ADN del gen 16S ribosomal.

2.4.B1. RESULTADOS

Fenotípicamente se analizaron 234 aislados, 155 del toruño (49 del exterior y 106 del interior), 30 del IRTA (29 del sistema y 1 de salvaje), 48 de santander (17 del tanque 1, 19 del tanque 2 y 12 de enfermos).

Genotípicamente, se han caracterizado 295 aislados de *Solea senegalensis*, 212 de El Toruño (77 aislados del sistema de cultivo externo y 135 del interno, todos de organismos sanos), 58 del IRTA (18 aislados de organismos enfermos, 38 de sanos y 2 de enfermos pero del medio silvestre) y 25 de Santander (13 de organismos enfermos y 12 de sanos, de éstos, seis aislados del tanque 1 y seis del tanque 2).

Para los antibiogramas se analizaron 115 aislados, 84 del toruño (4 del exterior y 80 del interior), 6 del irta y 41 de santander (17 del tanque 1, 21 del tanque 2 y 3 de enfermos).

La mayoría de los aislados se han podido identificar a nivel especie y solo dos a nivel género. Se han identificado nueve géneros, *Pseudoalteromonas* (1 especie), *Shewanella* (4), *Vibrio* (24), *Photobacterium* (1), *Salinivibrio* (1), *Psychrobacter* (3), *Marinomonas* (1), *Staphylococcus* (1) y *Acinetobacter* (1). De *Vibrio* (tabla 2), se identificaron 22 especies; *V. parahaemolyticus* fue la especie

mas común, seguida de *V. scophthalmi* y luego *V. ponticus*. Sólo *V. parahaemolyticus*, *V. cyclitrophicus*, *V. harveyi*, *V. scophthalmi*, *V. ponticus* y *V. rotiferianus* se encontraron en todas las localidades.

La única especie encontrada en un organismo enfermo fue *V. fortis*, pero sólo fue un aislado; *V. chagasii*, *V. fischeri*, *V. lentus*, *V. pectenecida*, *V. penaeicida* y *V. ponticus* (28.1% del total de identificados), sólo se aislaron de organismos sanos. El resto de las especies encontradas se localizaron tanto en peces sanos como en enfermos.

Species	El Toruño 17 especies	IRTA 10 especies	Santander 12 especies
<i>V. campbellii</i>	5	2	
<i>V. chagasii</i>	5	1	
<i>V. crassostreae</i>	6		4
<i>V. cyclitrophicus</i>	13	7	5
<i>V. fischeri</i>	18		
<i>V. fortis</i>		1	
<i>V. gigantis</i>		1	
<i>V. harveyi</i>	8	10	2
<i>V. ichthyoenteri</i>	1		
<i>V. kanaloae</i>	1		1
<i>V. lentus</i>	4		1
<i>V. ordalii</i>	1		
<i>V. pacinii</i>	1		
<i>V. parahaemolyticus</i>	50	14	2
<i>V. pectenecida</i>	1		
<i>V. penaeicida</i>	1		
<i>V. ponticus</i>	20	7	1
<i>V. rotiferianus</i>	15	6	7
<i>V. scophthalmi</i>	32	1	4
<i>Vibrio sp. nov. C</i>			1
<i>Vibrio sp. nov. D</i>			1
<i>V. splendidus</i>			1

2.5.B1. CONCLUSIONES

2.6.B1. VALORACIÓN

2.7.B1. DIFUSIÓN

Personal entrenado

- 1) Pietro Vidossich- Prácticas de empresa, Master de Acuicultura (Universidad de Barcelona)
- 2) Mar Marcos López- Prácticas de licenciatura (Universidad Autónoma de Barcelona)
- 3) Levent Dogankaya –Prácticas de doctorado, Programa Leonardo da Vinci (Universidad de Ankara, Turquía).

Presentaciones

- 1) B. Gómez-Gil, L. Dogankaya, D. Furones, N. Duncan, E. Salas, I. García de la Banda, J.P. Cañavate, C. Lobo, A. Roque 2008 Análisis de vibrios aislados del lenguado (*Solea senegalensis*) obtenidos de tres localidades en España. VII Reunión de Microbiología del Medio Acuático Bilbao-2008
- 2) A. Roque, L. Dogankaya, D. Furones, N. Duncan, E. Salas, I. García de la Banda, J.P. Cañavate, C. Lobo y Bruno Gómez-Gil 2008. Analysis of the vibrios isolated from the Senegalese Sole cultured in three localities in Spain. 4th Workshop on the Cultivation of Soles. Centre of Marine Sciences (CCMAR), Faro, Portugal. 11-14 November 2008
- 3) A. Roque, L. Dogankaya, D. Furones, N. Duncan, E. Salas, I. García de la Banda, J.P. Cañavate, C. Lobo y Bruno Gómez-Gil. Analysis of the vibrios isolated from the Senegalese Sole cultured in three localities in Spain. *En preparación*.

2.8.B1. INCIDENCIAS DE DESARROLLO

2.9.B1. BIBLIOGRAFÍA

2.1.B2. OBJETIVO INICIAL B.2

B.2. Comprobar el papel de la bacteria en la enfermedad y contar con herramientas para probar mecanismos de control o prevención.

2.2.B2. OBJETIVOS REALIZADOS

Comprobar el papel de la bacteria en la enfermedad.

Contar con una herramienta para probar mecanismos de control o prevención.

2.3.B2. METODOLOGÍA

Ensayos de mortalidad de bacterias potencialmente patógenas aisladas en este proyecto

Inicialmente se estandarizó un método de infección por inyección. Para ello se llevó a cabo un experimento preliminar (“*range finding test*”) en el que grupos de 5 peces (5 - 10 g) fueron inyectados con diferentes densidades bacterianas de *Photobacterium damsela* subsp *damsela*. Como control se usó solución salina estéril al 2,5 % de NaCl. Una vez conocido el rango de amplitud de DL₁₀₀ y DL₅₀ se procedió a hacer experimentos para definir las usando duplicados de 10 peces.

Una vez determinados estos valores se procedió a llevar a cabo experimentos de “*screening*” de las bacterias aisladas durante este proyecto. En cada experimento se probaron 3 aislados usando por triplicado (10 organismos por acuario) la DL₅₀ (10⁵ ufc mL⁻¹) del patógeno *Photobacterium damsela* subsp *damsela* y un acuario inyectado con la DL₁₀₀ (10⁷ ufc mL⁻¹). Se consideró el mismo control usado anteriormente. El volumen de inyección fue siempre 10 mL por pez. Se ensayaron 30 aislados. El inóculo de inyección se preparó a partir de un cultivo puro en medio sólido siendo disuelto en solución salina estéril (2,5% NaCl) ajustando el nivel de turbidez al estándar de McFarland de 0,5. A partir de esta solución bacteriana se obtuvieron las diluciones deseadas siendo confirmada la densidad bacteriana por conteo en placa.

Ensayos de mortalidad mediante infección por cohabitación

Se emplearon cepas de *Photobacterium damsela* subsp. *damsela* aisladas a partir de brotes anteriores. Los aislados se mantuvieron a -80° C en crioviales. Para el inicio del cultivo, se añadió directamente un “*microbead*” a un tubo de ensayo que contenía caldo de soja triptona (TSB, Scharlau Chemie, Barcelona), complementado con un 2% (p/v) de NaCl y se incubó a 28 ° C durante 24 h. Las bacterias se mantuvieron en el tubo de ensayo durante un máximo de 10 días. La cepa se resembró en agar de soja triptona complementado con 2% de NaCl, siendo incubada a 28 ° C durante 24 - 48 h.

Se utilizaron lenguados (*Solea senegalensis*, Kaup) de aproximadamente 12 meses de edad, con 2,5 - 9 g y 6 - 9,5 cm de longitud total. Los peces se mantuvieron en acuarios rectangulares de vidrio (11 L de capacidad). Se proporcionó alimentación cada dos días.

Inicialmente se procedió a la inyección intramuscular (IM) para establecer la concentración y volúmenes óptimos en los experimentos de cohabitación siguientes. En estos, los peces fueron expuestos a *Ph. damselae* mediante la introducción de peces que habían sido inyectados con la bacteria viva. Se usó un ratio 1:1 entre los peces de prueba y los peces inyectados. Después de la inyección, cada uno de los peces fue marcado con una etiqueta de elastómero negro subcutánea (Northwest Marine Technology, Shaw Island, USA) indicando su tratamiento. Grupos control fueron utilizados para determinar tanto el efecto de la inyección como el sistema de marcado. El experimento finalizó cuando no quedó ningún pez inyectado en los acuarios mientras que los peces restantes no mostraban signos clínicos externos. Los peces supervivientes fueron sacrificados. La tabla I muestra las concentraciones de bacterias, las dosis, la temperatura del agua y el número de peces utilizados en los experimentos.

Tabla I. Detalles de los experimentos de infección experimental. En los experimentos por cohabitación se detallan las dosis y las concentraciones de la suspensión de bacterias inoculadas por inyección.

Experimento	Método	Volumén	Densidad bacteriana (ufc mL ⁻¹)	Temperatura del agua (°C)	Número de individuos
1*7	cohabitación	125 µL	2,1 x 10 ⁸	19	3
2*8	cohabitación	125 µL	2,1 x 10 ⁸	22	3
3*9	cohabitación	50 µL	2,6 x 10 ⁸	19	3
4*10	cohabitación	25 µL	2,6 x 10 ⁸	19	3
5*11	Inyección i.m.	50 µL	1,5 *10 ² a x 10 ⁷	19	18 (3x6)
6*12	Inyección i.m.	25 µL	1,5 *10 ² a x 10 ⁷	19	18 (3x6)
7*13	cohabitación	25 µL	1,4 x 10 ⁴	19	5
8*14	cohabitación	25 µL	1,4 x 10 ⁵	19	5
9*15	cohabitación	25 µL	5,4 x 10 ⁴	19	5
10*16	cohabitación	25 µL	5,4 x 10 ⁴	22	5
11*17	cohabitación	25 µL	5,4 x 10 ⁵	19	5
12*18	cohabitación	25 µL	5,4 x 10 ⁵	22	5

2.4.B2. RESULTADOS

Ensayos de mortalidad de aislados bacterianos de bacterias potencialmente patógenas aisladas en este proyecto

Los aislados bacterianos ensayados y las mortalidades inducidas se muestran en la tabla II:

Tabla II.

Aislado	Localidad	Órgano	Mortalidades
S267	IRTA	bazo enfermo	0
S268	IRTA salvaje	úlceras enfermo	15% inyectados con $2,1 \times 10^5$ 10% inyectados con $2,1 \times 10^7$
S269	IRTA	riñón enfermo	10% inyectados con $6,1 \times 10^7$
S270	IRTA	bazo enfermo	0
S271	IRTA	branquia enfermo	0
S272	IRTA	bazo enfermo	5% inyectados con $5,8 \times 10^5$
S273	IRTA	riñón enfermo	10% inyectados con $5,8 \times 10^7$
S274	IRTA	bazo enfermo	0
S275	IRTA	riñón enfermo	0
S316	Santander	riñón enfermo	5% inyectados con $9,3 \times 10^7$
S317	Santander	riñón enfermo	0
S318	Santander	riñón enfermo	0
S319	Santander	piel enfermo	0
S320	Santander	riñón enfermo	0
S321	Santander	piel enfermo	0
S322	Santander	piel enfermo	0
S323	Santander	riñón enfermo	0
S324	Santander	bazo enfermo	0
S22	Santander	piel sano	0
S23	Santander	piel sano	0
S24	Santander	riñón sano	0
S26	Santander	piel sano	0
S27	Santander	riñón sano	0
S30	Santander	branquia sano	0

Una vez obtenidos estos resultados se decidió replantear el objetivo de cara a implementar y estandarizar técnicas de infección experimentales relevantes. Para ello se procedió a la realización de ensayos de infección por cohabitación.

Ensayos de mortalidad mediante infección por cohabitación

En las pruebas iniciales para los experimentos de cohabitación (experimentos 1, 2, 3 y 4), todos los peces inyectados murieron el día siguiente a la inyección y no se observó mortalidad entre los peces de ensayo. Estos ensayos mostraron que la cepa que se estaba trabajando era virulenta. Para establecer una dosis letal máxima que permitiera la cohabitación entre los peces de prueba y los inyectados, se realizaron los experimentos 5 y 6 (tabla I). Densidades bacterianas de 10^4 y 10^5 ufc mL⁻¹ parecen ser las más apropiadas para las experiencias de cohabitación proporcionando el periodo de tiempo mas largo entre en la aparición de la infección y el momento de la muerte (Tabla III).

Tabla III: Inyección intramuscular de *Ph. damsela* subsp. *damsela* en diferentes concentraciones y volúmenes. Tres peces fueron inyectados para cada concentración. Número de peces muertos por día.

ufc mL ⁻¹	día 1	día 2	día 3	día 4	día 5	día 6
25 µL						
$1,45 \times 10^7$	2	1	--	--	--	--
$1,45 \times 10^6$	0	3	--	--	--	--
$1,45 \times 10^5$	0	2	1	--	--	--
$1,45 \times 10^4$	0	0	0	1	0	0
$1,45 \times 10^3$	0	0	0	0	0	0
$1,45 \times 10^2$	0	0	0	0	0	0
50 µL						
$1,45 \times 10^7$	3	--	--	--	--	--
$1,45 \times 10^6$	0	3	--	--	--	--
$1,45 \times 10^5$	0	2	1	--	--	--
$1,45 \times 10^4$	0	0	0	3	--	--
$1,45 \times 10^3$	0	0	0	0	0	0
$1,45 \times 10^2$	0	0	0	0	0	0
control (SSS)	0	0	0	0	0	0

Para las dosis más altas, los peces inyectados murieron los dos primeros días después de la inyección (tabla III), mientras que a bajas concentraciones los peces inyectados no desarrollaron los signos de Vibriosis. En los experimentos de cohabitación 7 y 8 (tabla I), la mortalidad se observó sólo entre los peces inyectados (tabla IV). En este momento se decidió facilitar la transmisión de la infección por i) el aumento de la temperatura y ii) daños mecánicos en la piel con la supresión de algunas escamas (experimentos 9-12, Tabla I). Inesperadamente, no se manifestaron signos de la enfermedad, y no se registraron muertes 6 días después de la inyección.

Tabla IV: Cohabitación con peces inyectados con 25 μL de las suspensiones *Ph. damsela* subsp. *damsela* a dos concentraciones. En el control 1, cinco peces fueron inyectados con 25 μL de una suspensión de $1,4 \times 10^5$ ufc mL^{-1} . En el control 2, cinco peces fueron inyectados con 25 μL de una suspensión de $1,4 \times 10^4$ ufc mL^{-1} . En el control 3, cinco peces fueron inyectados con una solución salina estéril. Número de peces muertos por día (los números marcados con un asterisco indican peces que saltaron de los acuarios).

ufc mL^{-1}	día 1	día 2	día 3	día 4	día 5	día 6	día 7	día 8	día 9
1									
$1,4 \times 10^5$	0	0	3 _{tag}	2 _{tag}	0	0	0	0	0
control 1	0	0	5	--	--	--	--	--	--
$1,4 \times 10^4$	0	1 _{tag}	1 _{tag}	2 _{tag} +1*	0	0	1 _{tag}	--	--
control 2	0	0	0	1*	0	1	1	0	0
control 3	0	0	0	0	0	0	0	0	0

2.5.B2. CONCLUSIONES

2.6.B2. VALORACIÓN

2.7.B2. DIFUSIÓN

2.8.B2. INCIDENCIAS DE DESARROLLO

2.9.B2. BIBLIOGRAFÍA

2.1.B3. OBJETIVO INICIAL B.3

B.3. Encontrar factores de predisposición para desencadenar enfermedades en el lenguado.

2.2.B3. OBJETIVOS REALIZADOS

1) Estudio del efecto de la densidad de cultivo sobre el crecimiento, hábito alimenticio y consumo metabólico en el cultivo intensivo de *Solea senegalensis*.

2) Estudio el efecto de la homogeneidad del grupo cultivado así como de las condiciones de cultivo (densidad de estabulación y ración alimenticia) sobre el crecimiento y la dinámica de población en juveniles cultivados de *S. senegalensis*.

3) Influencia de la densidad de estabulación y la alimentación sobre el crecimiento (expresión génica relativa de los genes IGF-I e IGF-II), la fisiología (biomarcadores de estrés celular HSP70 y HSP90) y el sistema inmune innato (expresión génica relativa de la lisozima-G y hepcidina-C) en juveniles de lenguado durante el engorde.

4) Identificación de biomarcadores de estrés por hiperoxia en juveniles de lenguado. Estudio de condiciones físico-químicas responsables de inducir brotes de enfermedad de la burbuja (GBD) en estanques de tierra. Descripción de la sintomatología asociada a GBD. Búsqueda de patrones alterados de proteínas.

2.3.B3. METODOLOGÍA

Para objetivo 1:

Se emplearon juveniles de *S. senegalensis*, con un peso medio de 70 g, estabulados inicialmente en tanques de fibra de 1/2 m² según cuatro condiciones de carga diferentes: 2, 7, 15 y 30 kg m⁻². Los experimentos tuvieron una duración de 60 días. El sistema de flujo continuo empleado garantizó un caudal de agua que permitió 25 renovaciones al día. Este aporte en exceso de agua mantuvo el nivel de oxígeno disuelto en 6,1 + 0,2 mg/L (79,6 + 0,2 % saturación) en todas las densidades estudiadas. Los animales fueron alimentados *ad libitum* seis días a la semana con pienso comercial en horario nocturno. La ración de alimento fue 1,0 % – 1,2 % del total de la biomasa de peces existente en el tanque. Un exhaustivo protocolo de limpieza fue aplicado diariamente. Ningún agente químico preservante así como tratamientos antibióticos fueron empleados en ningún momento.

Para determinar su crecimiento (peso y longitud total) los lenguados fueron muestreados los días 0, 20, 40 y 60 de cultivo. Para la evaluación de la respuesta alimenticia, 15 individuos de cada densidad de cultivo fueron sacrificados los días 40 y 60 una vez las supuestas jerarquías debían haberse establecido. Estos

animales fueron pesados y el contenido de sus tractos digestivos cuantificado. Para ello, se procedió a la disección de estómagos e intestinos depositándose el contenido de ambos en placas individualizadas, previamente pesadas mediante balanza de precisión (10⁻⁴ g). Posteriormente, dichas placas fueron secadas a 50° C durante 48 h y pesadas de nuevo con el objetivo de obtener el peso seco del contenido de los respectivos tractos digestivos.

Como método indirecto de cálculo del gasto metabólico, las tasas de consumo de oxígeno fueron estudiadas en un segundo grupo de ensayos. Bajo las mismas condiciones experimentales, se realizaron mediciones de oxígeno disuelto en el agua en presencia y ausencia de actividad alimenticia para cada una de las densidades de cultivo. Los mismos tanques usados anteriormente fueron transformados en respirómetros. Una vez se llenaron los tanques y antes de proceder a las mediciones de oxígeno disuelto, el caudal de entrada de agua fue cerrado y la salida del tanque bloqueada. Un medidor portátil de oxígeno acoplado a su correspondiente sensor fue usado para registrar los valores de oxígeno cada 30 s. Todas las mediciones se hicieron por triplicado dentro del intervalo 8 - 6 mg O₂ l⁻¹. Con esta metodología, el consumo de oxígeno fue medido para dos condiciones diferentes: ausencia y presencia de actividad estimulada por alimento. Los animales se mantuvieron inicialmente en ayunas durante 72 h antes de que las primeras mediciones se realizaran. Los lenguados fueron entonces alimentados de nuevo durante 7 días antes de que el mismo protocolo de mediciones fuera repetido. Las concentraciones de oxígeno disuelto se hicieron relativas a la biomasa y al tiempo (mg O₂ kg⁻¹ h⁻¹), y los consiguientes consumos de oxígeno promedio en el rango de 8 - 6 mg/L calculados para ambas condiciones.

Para objetivo 2:

Se emplearon juveniles de *S. senegalensis*, con un peso promedio comprendido entre 50 y 350 g. Los lenguados fueron cultivados en tanques rectangulares de fibra de vidrio con una superficie de 0,5 m². Los diferentes ensayos tuvieron una duración de 60 días. Los animales fueron alimentados con pienso comercial seco (1,0 % del total de la biomasa de peces) durante cinco días a la semana. El tamaño del grano fue adaptado al tamaño del animal. La temperatura promedio del agua fue 19,1 ± 0,2 °C, la salinidad varió entre 32 ‰ y 38 ‰ y el pH entre 8,0 y 8,2. Se fijó un fotoperiodo 12L:12D. Los niveles de oxígeno disuelto promediaron 6,4 ± 0,4 mg/L (84,9 ± 6,4 % saturación). No se empleó tipo alguno de agente químico o tratamiento antibiótico.

Para la caracterización individual de las tasas de crecimiento, se utilizaron marcas visibles de elastómeros, implantadas en los lados ciegos de los lenguados. Un código basado en el número, color y localización de la marca permitió la identificación individual de los animales durante los muestreos. Los lenguados fueron individualmente muestreados para la medición del tamaño (peso y longitud total) los días 0, 20, 40 y 60 de cultivo. El tamaño muestral comprendió la población completa en cada punto de muestreo.

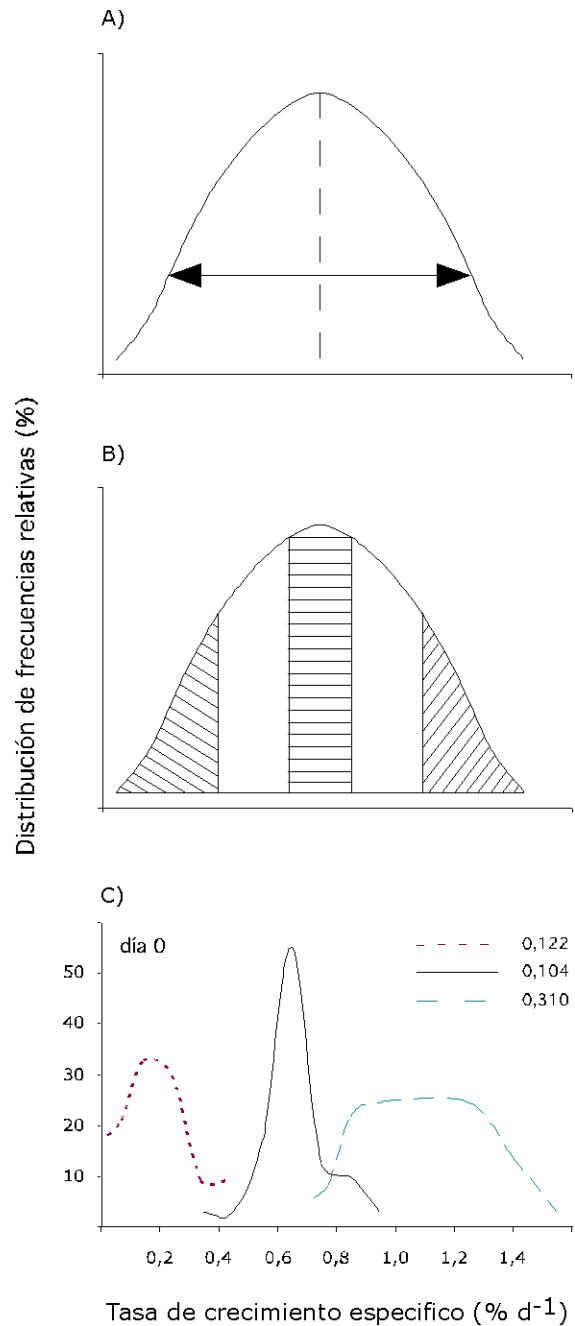
Se dispusieron inicialmente tres grupos diferentes de juveniles de *S. Senegalensis* homogéneos en tamaño: pequeños, medianos y grandes con pesos promedio (\pm e.s) de $125,5 \pm 1,8$, $187,8 \pm 1,4$ y $285,9 \pm 6,4$ g, respectivamente (Tabla 1). Coeficientes de variación (CV) iniciales menores de 19 % confirmaron la homogeneidad de los grupos constituidos. Dos grupos formados por animales heterogéneos en tamaño, denominados Control 1 y Control 2 y pesos promedio aproximados de $78,1 \pm 5,4$ y $155,1 \pm 6,3$ g respectivamente, fueron considerados como controles. Sus CVs respectivos fueron $37,6 \pm 2,2$ y $37,4 \pm 2,7$ %. La tasa de crecimiento específico (SGR) general así como la dinámica de crecimiento poblacional fueron comparadas entre los diferentes grupos.

Se realizó un cultivo inicial de 240 juveniles y los crecimientos individuales de todos los animales se registraron después de 60 días. A continuación, se formaron distintas subpoblaciones para dar lugar a tres grupos experimentales (Figura 1). Lengüados que habían exhibido una SGR promedio de $1,04 \pm 0,04$ % d^{-1} (alto), $0,66 \pm 0,02$ % d^{-1} (medio) y $0,18 \pm 0,02$ % d^{-1} (bajo) fueron agrupados por separado en sus respectivos tanques. Los dos grupos control empleados anteriormente fueron también usados como control para la heterogeneidad de crecimiento. Ya que estos grupos control tuvieron valores similares de SGR y dinámica de crecimiento poblacional después de 60 días, sus resultados fueron considerados como una unidad. Estas poblaciones ensayadas tuvieron un coeficiente de variación (CV) superior al 35%.

Tabla I. Coeficiente de variación (CV, %), peso de lenguado promedio (g), densidad de cultivo ($kg\ m^{-2}$) y crecimiento (SGR, % d^{-1}) a diferentes tiempos en función de la separación por tamaño de los peces. Diferentes superíndices indican diferencias significativas ($P < 0,05$) entre grupos experimentales.

		Control 1		Control 2		Pequeños		Medianos		Grandes	
		Media	e.s	Media	e.s	Media	e.s	Media	e.s	Media	e.s
CV	d 0	37,62	2,2	37,40	2,7	17,83	2,4	18,35	0,8	13,65	2,1
	d 20	38,40	0,6	38,10	3,0	18,96	1,3	18,07	0,7	13,05	1,8
	d 40	38,51	0,1	39,00	4,4	19,29	0,9	17,32	0,2	13,52	1,9
	d 60	39,02	0,6	39,10	4,7	18,20	1,0	17,37	0,7	13,25	0,1
Peso	d 0	78,07	5,4	155,10	3,3	125,52	1,8	187,80	1,4	285,93	6,4
	d 20	86,25	6,0	181,10	3,4	138,80	0,5	211,26	0,9	317,82	5,9
	d 40	96,11	6,7	212,40	2,4	149,79	3,3	226,93	0,7	346,14	7,1
	d 60	110,78	7,8	229,00	6,9	168,80	3,9	252,11	0,5	380,76	6,3
Dens cultiv	d 0	3,12	0,2	6,20	0,1	5,02	0,1	7,51	0,0	11,43	0,1
	d 20	3,45	0,2	7,24	0,1	5,55	0,0	8,45	0,1	12,71	0,1
	d 40	3,84	0,1	8,49	0,1	5,99	0,1	9,07	0,3	13,84	0,2
	d 60	4,43	0,1	9,16	0,3	6,75	0,2	10,08	0,3	14,80	0,4
SGR	d 20	0,59 ^{ab}	0,05	0,66 ^a	0,03	0,51 ^b	0,03	0,57 ^{ab}	0,02	0,55 ^b	0,02
	d 40	0,57 ^b	0,03	0,72 ^a	0,02	0,45 ^c	0,02	0,47 ^c	0,03	0,49 ^c	0,02
	d 60	0,62 ^a	0,03	0,64 ^a	0,02	0,50 ^b	0,02	0,53 ^b	0,02	0,51 ^b	0,02

Figura 1. Procedimiento metodológico seguido para la obtención de grupos de crecimiento homogéneos. A) Un cultivo inicial de 60 días permitió obtener una distribución poblacional de la tasa de crecimiento. B) Selección de individuos según crecimiento previo y separación en subpoblaciones homogéneas. C) Distribuciones iniciales (día 0 de los grupos experimentales tras su separación por crecimiento previo: alto (1,04 %d⁻¹) (línea discontinua), medio (0,66 %d⁻¹) (línea continua) y bajo (0,18 %d⁻¹) (línea de puntos). El valor de la desviación estándar resultante es indicado en el extremo superior derecha para cada uno de los grupos de estudio.



Para estudiar la influencia de la densidad de cultivo y la ración alimenticia sobre la dinámica poblacional de crecimiento, se cultivaron juveniles de *S. Senegalensis* bajo dos densidades diferentes: alta (N = 110) y baja (N = 20). El peso promedio y la densidad de cultivo iniciales para el grupo cultivado a mayor densidad fueron $143,4 \pm 6,8$ g y $30,9 \pm 0,8$ kg m⁻², respectivamente. Los mismos dos grupos de lenguados usados antes como fueron considerados como la población de densidad baja (N = 20). 60 y 20 individuos previamente marcados (correspondiente al 55 y 100 % de la población experimental) fueron muestreados para las condiciones alta y baja densidad de peces, respectivamente.

Para el estudio del efecto de la ración alimenticia sobre el crecimiento poblacional y la estructura jerárquica de la población se establecieron dos raciones alimenticias: 0,25 % (baja) y 1 % del total de la biomasa de peces. El peso promedio inicial de los lenguados cultivados a bajo régimen alimenticio fue $149,5 \pm 4,85$ g.

Las tasas de crecimiento específico individual (SGR) fueron calculadas a partir de los pesos individuales obtenidos los días 0, 20, 40 y 60 (Houde y Schekter, 1981). Las correspondientes densidades de cultivo también fueron obtenidas. Únicamente en aquellas poblaciones que habían mostrado un crecimiento previo homogéneo se calculó el ratio de conversión de alimento (FCR) (biomasa de pez producida por kg de pienso suministrado).

La normalidad de las distribuciones de crecimiento fue comprobada mediante el test Kolmogorov-Smirnov ($P > 0,01$). La homogeneidad de varianzas fue analizada empleando el contraste F-Fisher para las desviaciones estándar ($P > 0,05$). Una vez la similitud de varianzas fue confirmada, se determinaron diferencias estadísticamente significativas entre los valores medios mediante el t-test no pareado ($P < 0,05$). Diferencias significativas referentes a FCR fueron analizadas mediante ANOVA de una vía. Para estudiar la relación de dependencia entre la tasa de crecimiento individual en relación a su tamaño respectivo, se aplicaron regresiones lineales a los grupos de peces estudiados ($P > 0,05$).

Para objetivo 3:

Durante 60 días se cultivaron juveniles de *S. Senegalensis* con un peso medio de 148,32. Los lenguados fueron estabulados en tanques rectangulares de fibra de vidrio de 0,5 m² bajo dos densidades diferentes: 7 y 30 kg m⁻². Los animales fueron alimentados con pienso comercial seco durante seis días a la semana. Dos raciones alimenticias diferentes, 0,25 y 1,0 % del total de la biomasa de peces, fueron suministradas a cada una de las condiciones de carga. La temperatura del agua fue $18,4 \pm 0,1$ °C, la salinidad varió entre 32 ‰ y 38 ‰ y el pH entre 8,0 y 8,2. Se fijó un fotoperiodo 12L:12D (80 lux durante la fase de luz). Los niveles de oxígeno disuelto fueron $6,6 \pm 0,2$ mg/L ($86,2 \pm 2,0$ % saturación). A lo largo de los cultivos, ni agentes químicos ni tratamientos antibióticos fueron empleados en momento alguno.

El crecimiento de los lenguados fue caracterizado a partir del peso y longitud totales medidos los días 0, 20, 40 y 60 una vez iniciado el experimento. El tamaño de muestra comprendió el 100 y 55 % de la población total (24 y 60 individuos por réplica) en el caso de 7 y 30 kg m⁻², respectivamente.

Con el objetivo de realizar los análisis de expresión génica, 9 individuos de cada grupo experimental (densidad de cultivo y régimen alimenticio) fueron sacrificados a día 60. Los hígados y riñones de los individuos sacrificados fueron extraídos, congelados en nitrógeno líquido y almacenados a - 80 °C hasta su análisis. a homogenización inicial de cada uno de los tejidos permitió la obtención de una cantidad de 50 mg a partir de la cual se aisló ARN total. La calidad de la muestra de este ARN se verificó en gel de agarosa y su cuantificación se realizó mediante técnica espectrofotométrica. 1 µg de cada muestra de ARN total fue transcrita de manera inversa. Para confirmar la ausencia de ADN genómico en las muestras de ARN total, esta se amplificó por PCR en ausencia de síntesis de ADNc. Las reacciones fueron realizadas en un volumen de 25 µL que contenían ADNc obtenido a partir de 10 ng de muestra de ARN original, 300 nM de cada uno de los cebadores “forward” y “reverse”, y 12,5 µL de iQTM SYBR Green Supermix (Bio-Rad). El protocolo de amplificación usado fue el siguiente: desnaturalización inicial y activación enzimática durante 7 min a 95 °C, seguido por 40 ciclos de 95 °C durante 15 s, y 70 °C durante 30 s. Para la normalización de la carga de ADNc, todas las muestras fueron corridas en paralelo usando como “housekeeping” el gen de la ubiquitina. La expresión relativa de ARNm se determinó usando el método 2^(-ΔΔCt) (Livak y Schmittgen, 2001).

Las tasas de crecimiento específico poblacionales (SGR) fueron calculadas a partir de los pesos individuales obtenidos los días 0, 20, 40 y 60 (Houde y Schekter, 1981). Las correspondientes densidades de cultivo también fueron obtenidas. Diferencias en SGR promedio entre lenguados estabulados a 7 y 30 kg m⁻² para cada régimen alimenticio fue determinado mediante ANOVA de una vía (P < 0,05), teniendo previamente en cuenta la normalidad de la distribución de los datos y la homogeneidad de varianzas.

Para determinar diferencias significativas en la expresión génica causadas por las densidades de cultivo y los regímenes alimenticios, se realizó una ANOVA de doble vía. Los tests Kolmogorov-Smirnov y Shapiro-Wilk confirmaron una distribución normal de los datos de expresión génica, previamente transformados logaritmicamente. Además, la interacción entre los dos principales efectos (P < 0,05) fue determinada.

Para objetivo 4:

Se emplearon dos estanques independientes de tierra. En el estanque donde se indujo la sobresaturación de oxígeno (900 m²), denominado estanque GBD, se fijó un caudal de agua que permitió tan solo una única renovación al día. En el estanque control (100 m²), se programaron 4 renovaciones diarias, evitando así la proliferación de macroalgas responsables del incremento de los niveles de oxígeno disuelto.

Radiación, temperatura y oxígeno disuelto fueron medidos en ambos estanques. Una vez alcanzadas las condiciones máximas de hiperoxia y detectado los primeros peces muertos por *GBD*, la temperatura y el oxígeno disuelto fueron medidos cada 30 minutos a lo largo de un ciclo diario. Las primeras mortalidades tuvieron lugar una vez establecidas las condiciones hiperóxicas máximas en el estanque *GBD*. Individuos vivos pero afectados por *GBD* fueron recogidos con el fin de observar y describir los síntomas. Tres estados diferentes de salud fueron estudiados: (1) peces control completamente sanos (grupo C, n = 5), (2) peces afectados por hiperoxia pero sin síntomas (grupo NS, n = 7), y (3) peces afectados por *GBD* con síntomas visibles (grupo S, n = 3) (Tabla I). El peso medio de los lenguados capturados en el estanque *GBD* fue $4,36 \pm 1,15$ g mientras que los peces del estanque control pesaron $3,88 \pm 0,26$ g. Los animales fueron anestesiados, pesados y medidos. Sus branquias e hígados extraídos, congelados en N₂ líquido y almacenados a – 80 °C hasta su análisis.

Brevemente, el análisis proteómico constó de los siguientes pasos:

1. Preparación de las fracciones citosólicas y ensayo de proteínas
2. Análisis de electroforesis en dos dimensiones (2-DE)
3. Digestión en gel y análisis mediante espectrofotometría de masas (MS)
4. Identificación de proteínas

Los valores numéricos representan intensidades de manchas (unidades arbitrarias) expresadas como el valor medio \pm desviación estándar de cuatro geles para cada estado de salud. La significación estadística de las diferencias con respecto al grupo control fue analizada mediante el test t – Dunnett, y se muestra como: ns, no significativo; * p < 0,05, ** p < 0,01. La normalidad de los datos y la homogeneidad de la varianza fueron previamente comprobadas.

Tabla I. Número de proteínas de hígado y branquias con diferentes perfiles de expresión proteica.

	<i>Individuos sanos</i>	<i>GBD- Sin síntomas</i>	<i>GBD- Con Síntomas</i>
Branquias			
Presentes solo	33	16	40
Ausentes	68	64	28
Incrementadas	8	15	77
Disminuidas	9	62	5
Hígado			
Presentes solo	59	10	107
Ausentes	34	105	22
Incrementadas	7	-	89
Disminuidas	-	74	-

2.4.B3. RESULTADOS

Para el objetivo 1:

a) Indicadores de crecimiento

Los Lenguados cultivados bajo densidades iniciales de 2, 7, 15 y 30 kg m⁻² no mostraron diferencias significativas ($P > 0,05$) en lo que a peso se refiere después de 20, 40 o 60 días de cultivo, respectivamente. La densidad de cultivo inicial aumentó a lo largo del transcurso del experimento, destacando el valor máximo superior (45 kg m⁻²) obtenido tras sesenta días de cultivo en el caso de la mayor condición inicial de carga ensayada.

La productividad de biomasa de lenguado obtenida a partir de los pesos promedio finales resultó similar para todas las densidades de cultivo estudiadas (Figura 1). La ganancia de peso individual fue aproximadamente 0.6 g por día, lo que se corresponde con una ganancia relativa de peso superior al 0.8 % para animales con un peso promedio inicial de 70 g.

El efecto de la densidad de cultivo sobre la dispersión de tamaño de los lenguados cultivados fue determinado tras comparar las distribuciones de tamaño respectivas correspondientes a 2, 7, 15 y 30 kg m⁻², respectivamente. Los tests Kolmogorov-Smirnoff aplicados para la comparación de las distribuciones obtenidas los días 20, 40 y 60 no revelaron diferencias ($P > 0,05$) entre densidades para ninguno de los días de muestreo.

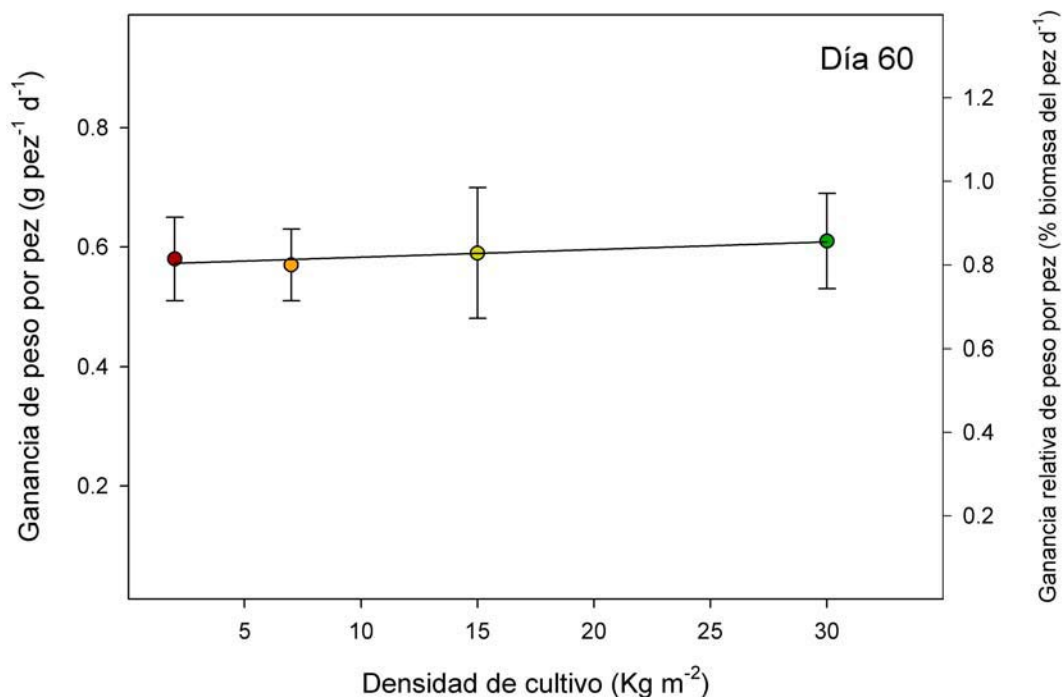


Figura 1. Ganancias de peso individual absoluta y relativa (valor medio \pm e.s.) obtenidas para cada condición de cultivo al final del experimento

b) Alimentación

La cuantificación del contenido de pienso existente en el tracto digestivo relativo al tamaño del propio individuo, obtenido para las diferentes condiciones de cultivo, mostró diferencias significativas ($P < 0,05$) entre los grupos estabulados a 2 y 7 kg m^{-2} y el grupo cultivado a 30 kg m^{-2} (Figura 2).

Aunque el incremento de las condiciones de carga favoreció una mayor ingestión de pienso, el contenido digestivo relativo resultó independiente respecto del tamaño del propio animal para todas las densidades de cultivo, según indican las pendientes no significativas ($P < 0,05$) obtenidas para la correlación entre las variables contenido digestivo y tamaño de lenguado (Figura 3). De este modo, se determinó un efecto nulo de la condición de carga sobre el establecimiento de jerarquías basadas en tamaño, en lo que al comportamiento alimenticio se refiere.

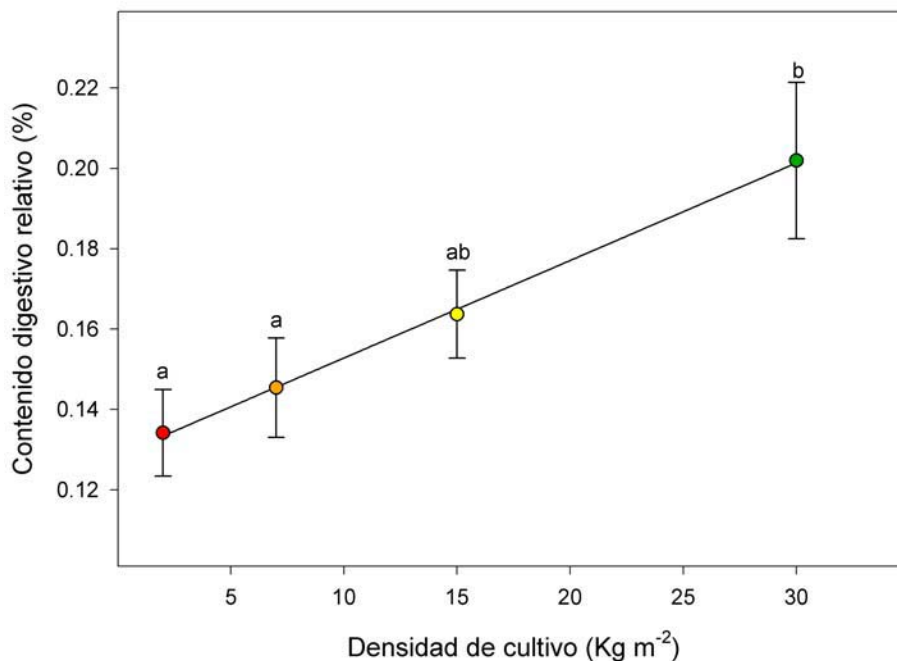


Figura 2. Contenido digestivo relativo (valor medio + e.s.) según densidad de cultivo. Letras superiores distintas indican diferencias significativas entre grupos

c) Consumo de Oxígeno

El consumo de oxígeno en ausencia de actividad alimenticia no mostró diferencias significativas ($P > 0,05$) entre las cuatro densidades de cultivo ensayadas (Figura 4). Sin embargo, una vez la actividad alimenticia era iniciada en los animales, sí se observaron diferencias ($P < 0,05$) asociadas a las condiciones de carga (Figura 4). Este mayor consumo de oxígeno favorecido por las condiciones de “*crowding*” coincidió con la mayor actividad alimenticia observada en lenguados cultivados bajo altas densidades (Figura 2). Para las diferentes condiciones de cultivo estudiadas, solo 2 kg m^{-2} fue la única en la cual el consumo de oxígeno no se afectó de manera significativa por la alimentación (Figura 4).

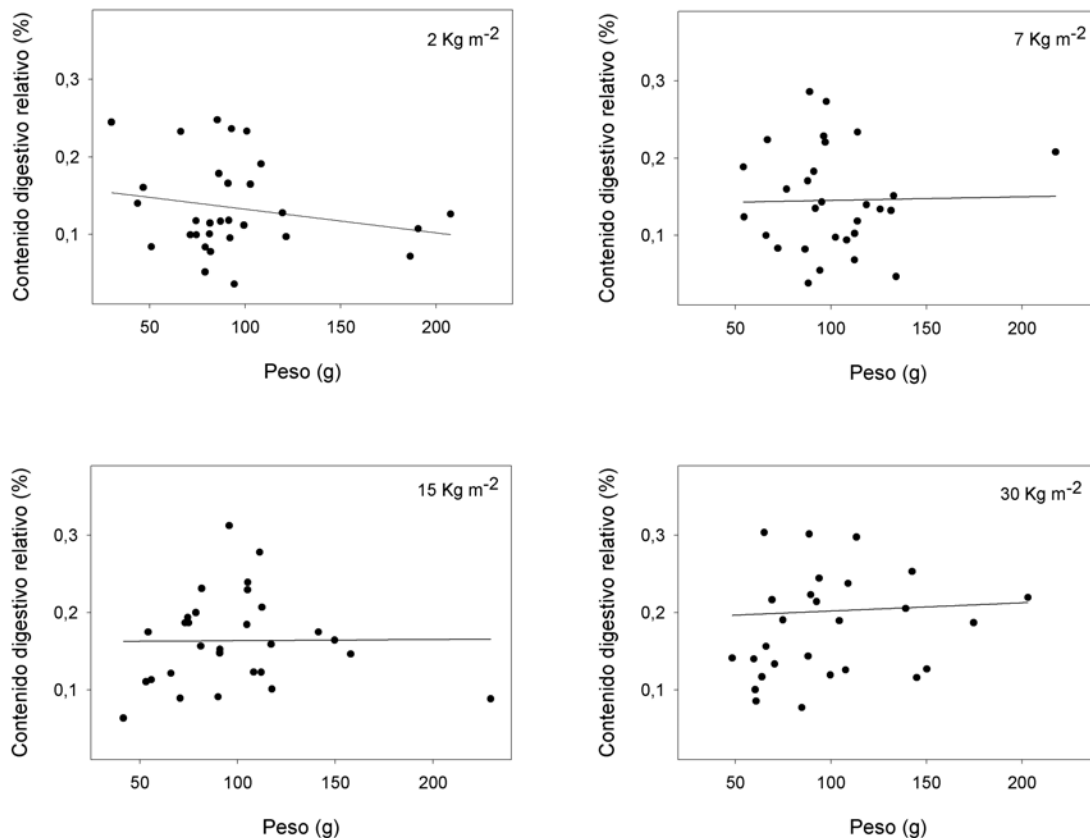


Figura 3. Relación entre contenido digestivo relativo y peso del animal

Para densidades mayores, la actividad más intensa desarrollada durante el proceso de alimentación se reflejó en mayores tasas de consumo de oxígeno.

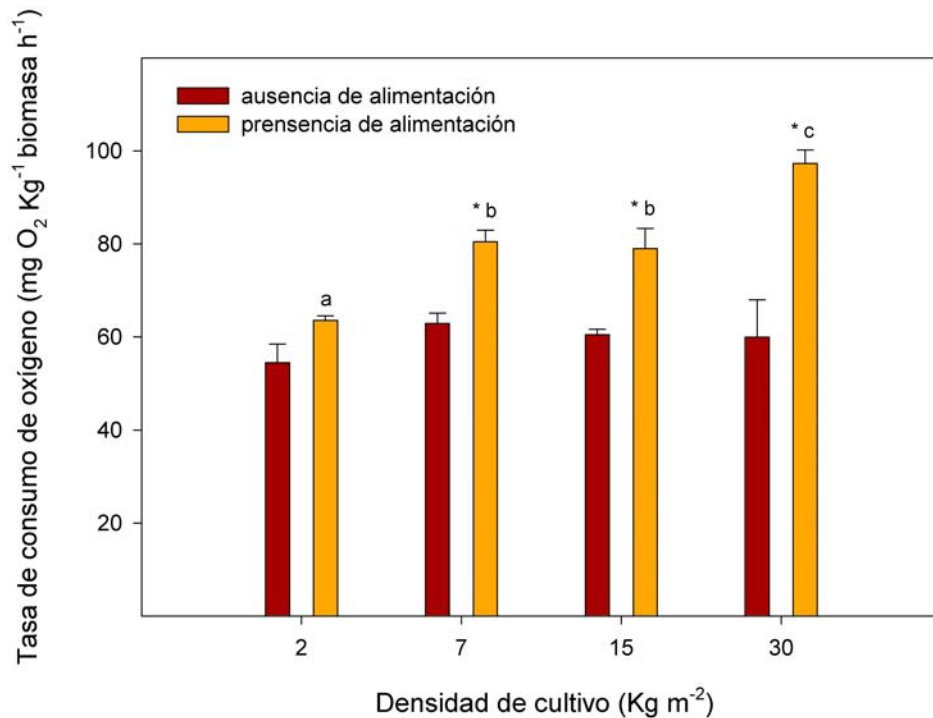


Figura 4. Consumo de oxígeno (media \pm e.s.) según la densidad de cultivo bajo ausencia y presencia de actividad alimenticia. Letras distintas indican diferencias significativas entre densidades bajo presencia de actividad alimenticia. * superior indica diferencias significativas entre ausencia y presencia de actividad alimenticia para la misma densidad de cultivo.

Para el objetivo 2:

a) Efecto de la clasificación por talla en crecimiento y dinámica población.

Control 1 y Control 2 exhibieron tasas de crecimiento similares, independientemente de que sus pesos promedio iniciales fueran 78,0 y 155 g, respectivamente. El crecimiento de estos animales sin clasificar fue significativamente superior ($P < 0,05$) que el mostrado por animales clasificados según su tamaño en cada uno de los días de muestreo (Tabla I). SGR no varió ($P > 0,05$) entre los grupos de lenguados pequeños, medianos y grandes a lo largo del experimento. Las poblaciones de lenguado sin clasificar mostraron mayores desviaciones estándar con respecto los grupos de lenguados clasificados para cada día de muestreo (Figura 2). Estas diferencias resultaron particularmente significativas ($P < 0,05$) a día 20. Las distribuciones poblacionales de la tasa de crecimiento fueron estrechándose a lo largo del tiempo. Las diferencias encontradas entre los grupos control y los homogéneos en tamaño fueron disminuyendo a medida que transcurrió el experimento.

b) Crecimiento y dinámica de población en grupos de lenguados con crecimiento previo homogéneo bajo, medio y alto.

El crecimiento de las tres subpoblaciones creadas a partir de individuos que habían mostrado previamente un crecimiento alto ($1,04 \pm 0,31 \% d^{-1}$), medio ($0,66 \pm 0,10 \% d^{-1}$) y bajo ($0,18 \pm 0,12 \% d^{-1}$) fue similar a lo largo de los 60 días del periodo experimental (Tabla II). Las tres subpoblaciones tendieron a mostrar unos mismos valores de SGR (aprox. $0,6 \% d^{-1}$) y FCR en todos los puntos de muestreo, independientemente de sus crecimientos previos. La comparación de estos entre las poblaciones de lenguado clasificadas y sin clasificar reveló un crecimiento significativamente superior ($P < 0,05$) a día 60 en la población que permaneció sin clasificar (Tabla II).

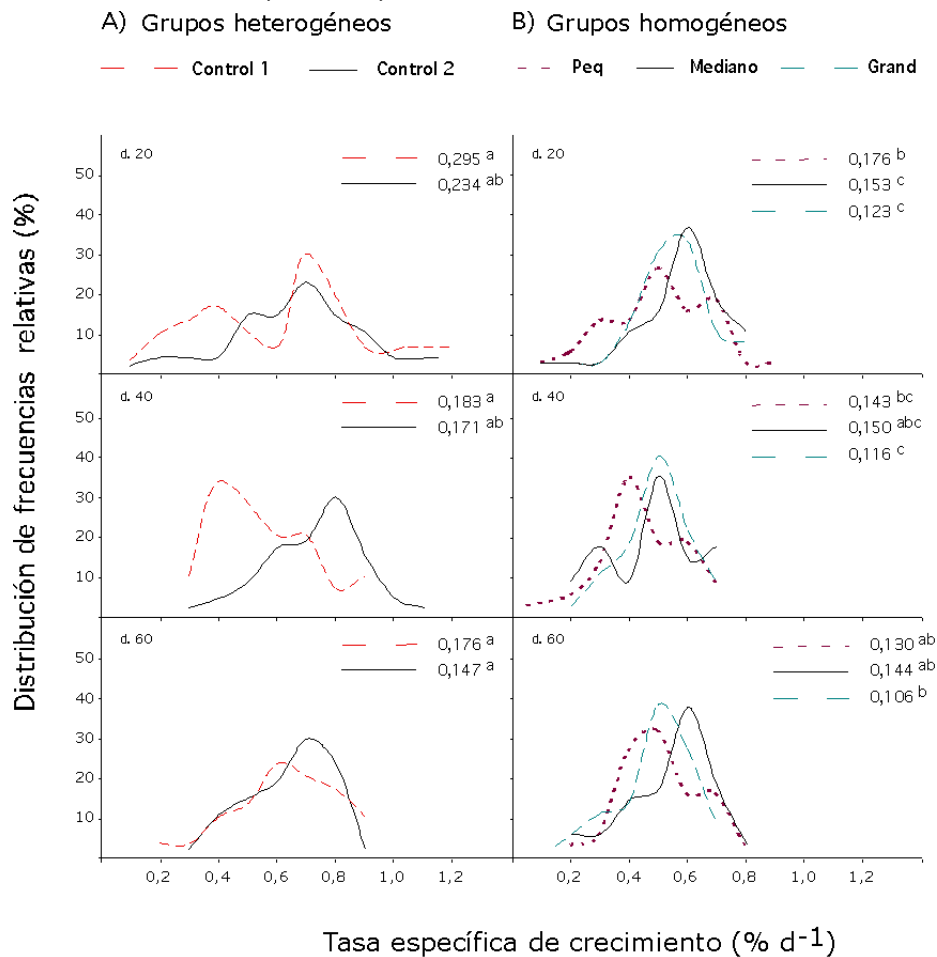


Figura 2. Distribución de la tasa de crecimiento en el tiempo en función de la clasificación por tamaño de los individuos. A) Grupos de lenguados sin clasificar (columna izquierda): Control 1 (línea discontinua) y Control 2 (línea continua); B) Grupos clasificados (columna derecha) según tamaño grande (línea discontinua), mediano (línea continua) y pequeño (línea de puntos). Las diferencias significativas ($P < 0,05$) para la desviación estándar (SD) entre grupos y día de muestreo se indican por letras diferentes.

Tabla II. Tasa de crecimiento específica promedio (SGR , % d^{-1}) (media \pm e.s.) y ratio de conversión de alimento (FCR) en grupos de animales sin clasificar (control) y en grupos de lenguados clasificados según su crecimiento previo alto, medio o bajo. Diferentes superíndices indican diferencias significativas entre grupos.

		Control		Crecimiento previo homogéneo					
				Alto (1,04 % d^{-1})		Medio (0,66 % d^{-1})		Bajo (0,18 % d^{-1})	
		Media	s.e.	Media	s.e.	Media	s.e.	Media	s.e.
SGR	d 20	0,63	0,03	0,66	0,04	0,65	0,04	0,71	0,05
	d 40	0,66	0,02	0,61	0,03	0,61	0,02	0,61	0,03
	d 60	0,63 ^a	0,02	0,58 ^{ab}	0,03	0,56 ^b	0,02	0,58 ^{ab}	0,03
FCR	d 20	0,88	0,10	0,92	0,03	0,91	0,09	0,99	0,10
	d 40	0,92	0,12	0,85	0,11	0,85	0,12	0,85	0,06
	d 60	0,88 ^a	0,05	0,81 ^{ab}	0,10	0,78 ^b	0,07	0,81 ^{ab}	0,06

Las diferentes subpoblaciones constituidas por animales de crecimiento previo alto, medio y bajo (día 0, Figura 1) convergieron en una misma distribución de crecimiento después de tan solo 20 días de cultivo (Figura 3). En esta ocasión también se obtuvo una tendencia a reducir la dispersión de crecimiento en todos los grupos experimentales (Figura 3). Las desviaciones estándar para el crecimiento resultaron similares (F-Fisher: $P > 0,05$) entre las poblaciones de individuos clasificados y sin clasificar.

La posibilidad de que el crecimiento de *S. Senegalensis* fuera estructurado de maneja jerárquica en base al tamaño del individuo fue determinada relacionando el crecimiento individual y su peso respectivo. Una correlación baja o incluso inexistente fue observada en todas las poblaciones.

c) Efecto de la densidad de lenguados y la ración alimenticia sobre la dinámica de crecimiento

No se encontraron diferencias significativas ($P > 0,05$) en términos de SGR entre individuos cultivados a alta ($N = 110$) o baja densidad ($N = 20$) después de 60 días de cultivo (Tabla III). Las poblaciones de lenguados cultivadas a alta densidad mostraron un mayor valor de desviación estándar en todos los puntos de muestreo (Figura 4. Columna A). Dichas diferencias resultaron significativas ($P < 0,05$) a día 60.

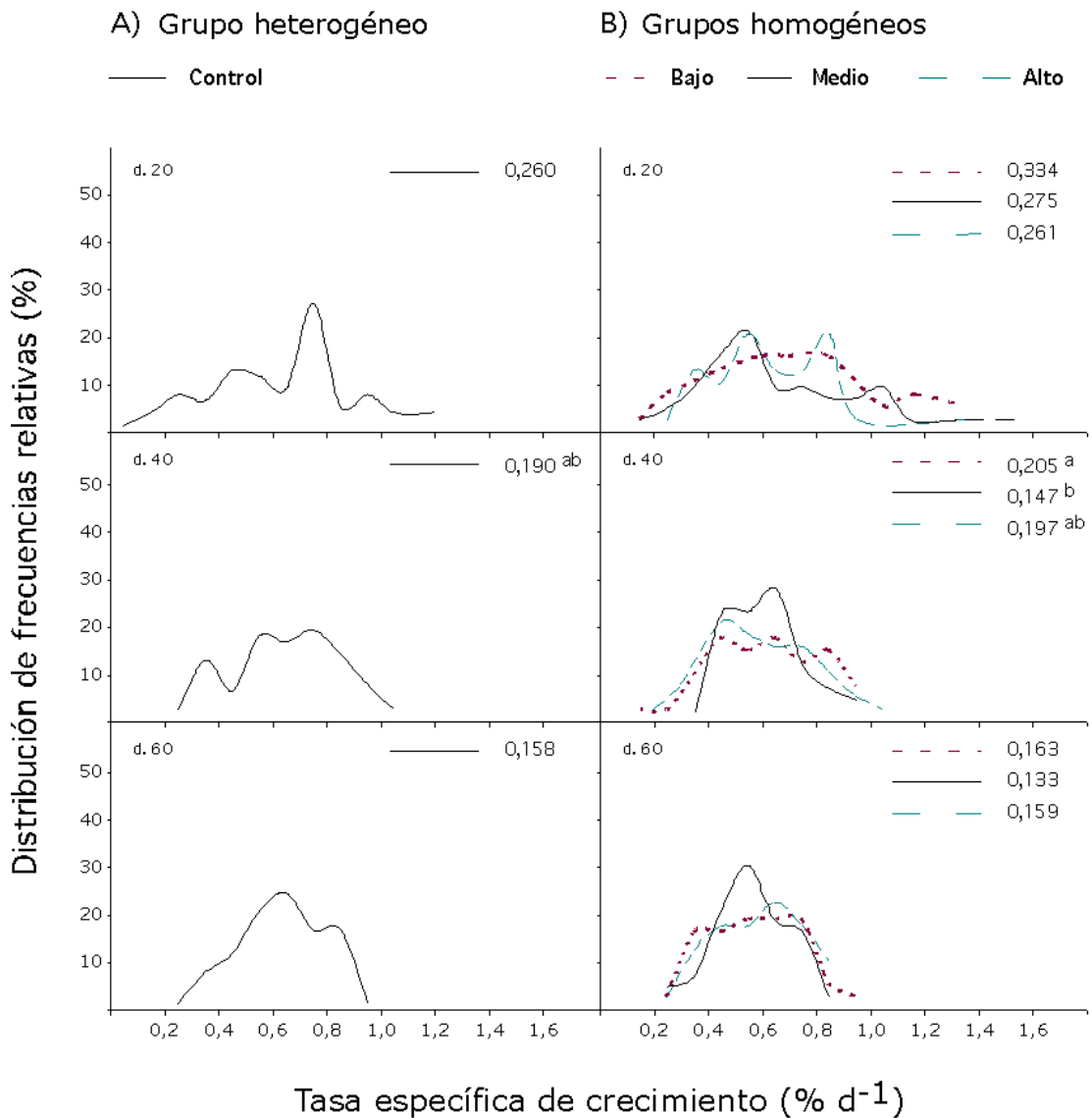


Figura 3. Distribución de la tasa de crecimiento a lo largo del tiempo en función de la clasificación según crecimiento previo de los individuos. A) Grupos de lenguados sin clasificar (columna izquierda); B) Grupos clasificados (columna derecha) según crecimiento previo alto (línea discontinua), medio (línea continua) y bajo (línea de puntos). Las correspondientes desviaciones estándar (*SD*) se indican para cada día de muestreo. Diferencias significativas ($P < 0,05$) referentes a la *SD* entre grupos son indicadas por letras diferentes. El número de individuos por tanque fue 24

Tabla III. Tasa de crecimiento específico (SGR , % d^{-1}) (valor medio \pm s.e.) de lenguados cultivados bajo dos densidades y dos regímenes alimenticios. Letras diferentes indican diferencias significativas ($P < 0,05$) entre el grupo ensayado a alta densidad (columna $N = 110$) y el control. Asterisco (*) en valores de SGR dentro de la columna 0,25 % indican diferencias significativas entre la ración alimenticia baja y el grupo control.

		Control (N=20; 1%)		N=110		0,25%	
		<i>Media</i>	s.e.	<i>Media</i>	s.e.	<i>Media</i>	s.e.
<i>SGR</i>	d 20	0,63 ^a	0,03	0,73 ^b	0,04	0,18*	0,03
	d 40	0,66 ^a	0,02	0,58 ^b	0,03	0,17*	0,02
	d 60	0,63	0,02	0,62	0,03	0,21*	0,02

La tasa de crecimiento específico disminuyó significativamente ($P < 0,05$) (3 veces más baja) en lenguados alimentados con una ración de 0.25 % (Tabla III). Especialmente interesante resultó que las poblaciones de lenguado alimentadas con 0.25 % y 1 % mostraron distribuciones de crecimiento caracterizadas por desviaciones estándar similares ($P > 0,05$) a lo largo de todo el periodo de cultivo (Figura 4. Columna B).

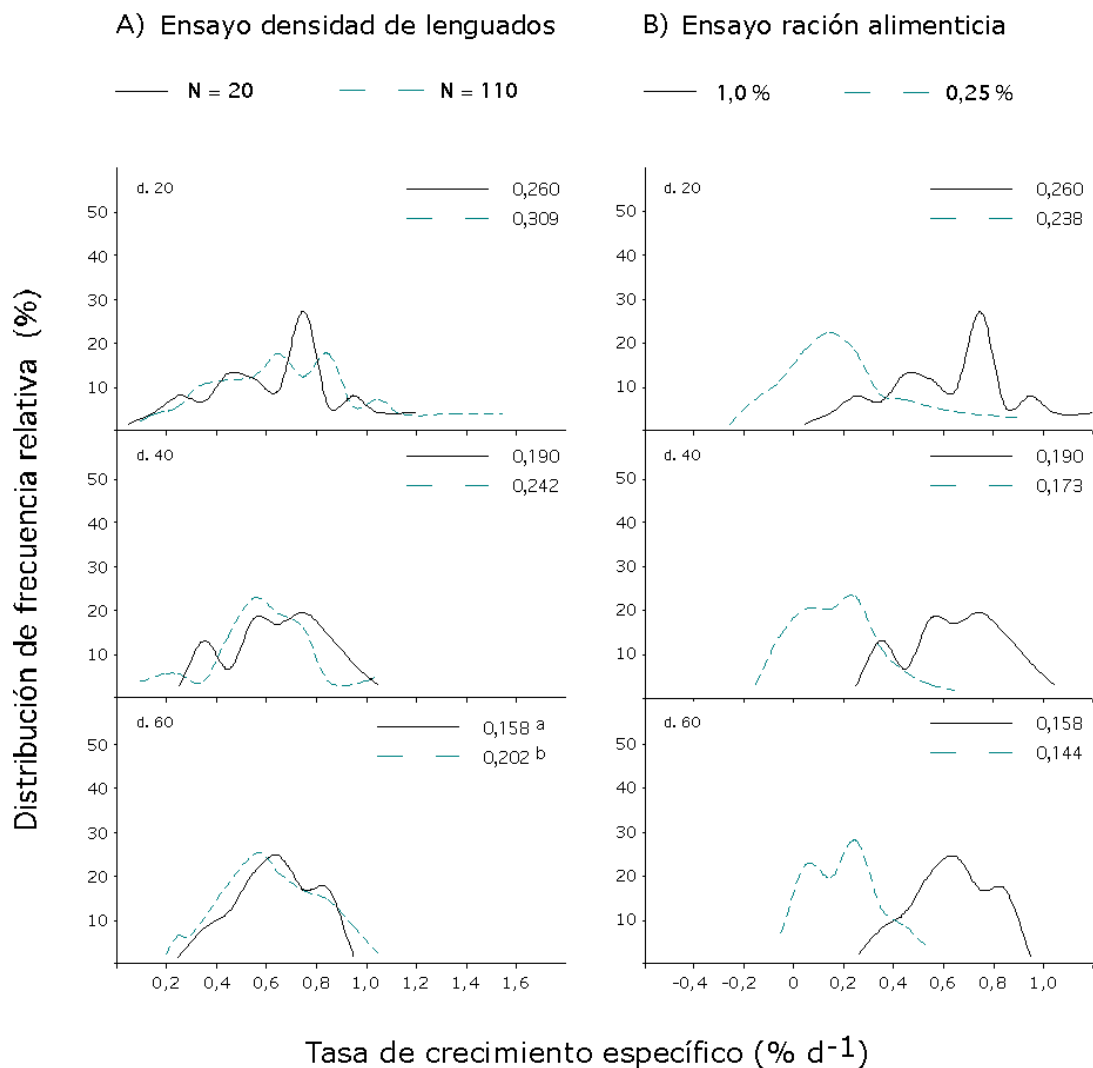


Figura 4. Distribución de la tasa de crecimiento a lo largo del tiempo. A) Ensayo de densidad de lenguados; N = 20 se observa en línea continua mientras que N = 110 se representa por línea discontinua. B) Ensayo de régimen alimenticio; línea continua indica una ración alimenticia de 1 % de la biomasa existente en el tanque mientras que 0,25 % se representa en línea discontinua. En este último ensayo el número de individuos por tanque fue 20. Las correspondientes desviaciones estándar (SD) se indican para cada día de muestreo. Diferencias significativas ($P < 0,05$) referentes a SD entre grupo experimental y control son indicadas por letras diferentes.

Para el objetivo 3:

a) Indicadores de crecimiento

La tabla I describe las densidades de cultivo iniciales así como las obtenidas tras 20, 40 y 60 días de experimento para cada régimen alimenticio (0,25 y 1,0 % de biomasa). No se detectaron diferencias significativas en *SGR* entre condiciones de carga a día 60 (Tabla I). En cambio, sí se observaron diferencias significativas con respecto a *SGR* entre regímenes alimenticios (~3.5 veces más a 1,0 %).

a.1) Expresión génica de IGFs

Los niveles totales de ARNm correspondientes a IGF-I disminuyeron significativamente en hígados de individuos cultivados a 30 kg m⁻² (Figura 1). En cambio, no se encontraron diferencias entre los regímenes alimenticios ensayados. En riñón, no se observó ningún cambio significativo entre densidades o regímenes alimenticios respecto a los niveles de transcritos de IGF-I.

De modo similar al gen IGF-I, los niveles de ARNm de IGF-II disminuyeron significativamente en hígados de animales cultivados a 30 kg m⁻² (Figura 1). No se identificaron cambios ($P > 0,05$) causados por la ración alimenticia ni en hígado ni en riñón. Así mismo, tampoco fue observada ninguna diferencia significativa en riñón provocada por la densidad de cultivo.

Tabla I: Tasas de crecimiento específico y evolución de las densidades de cultivo (kg m⁻²) en los grupos experimentales. Diferentes letras indican diferencias significativas entre densidades para una misma ración alimenticia y mismo día de muestreo.

	1,0 % Biomasa				0,25 % Biomasa							
	St.D	SGR		St.D	SGR		St.D	SGR				
		Media	s.e.	Media	s.e.	Media	s.e.	Media	s.e.			
día 0	7,45			30,97			7,17			31,81		
día 20	8,69	0,68	0,01	36,20	0,68	0,01	7,47	0,18 ^a	0,03	31,58	-0,04 ^b	0,05
día 40	10,19	0,73 ^a	0,02	38,65	0,56 ^b	0,02	7,72	0,17	0,02	33,76	0,14	0,04
día 60	10,99	0,65	0,01	43,32	0,59	0,01	8,13	0,21	0,03	34,99	0,17	0,03

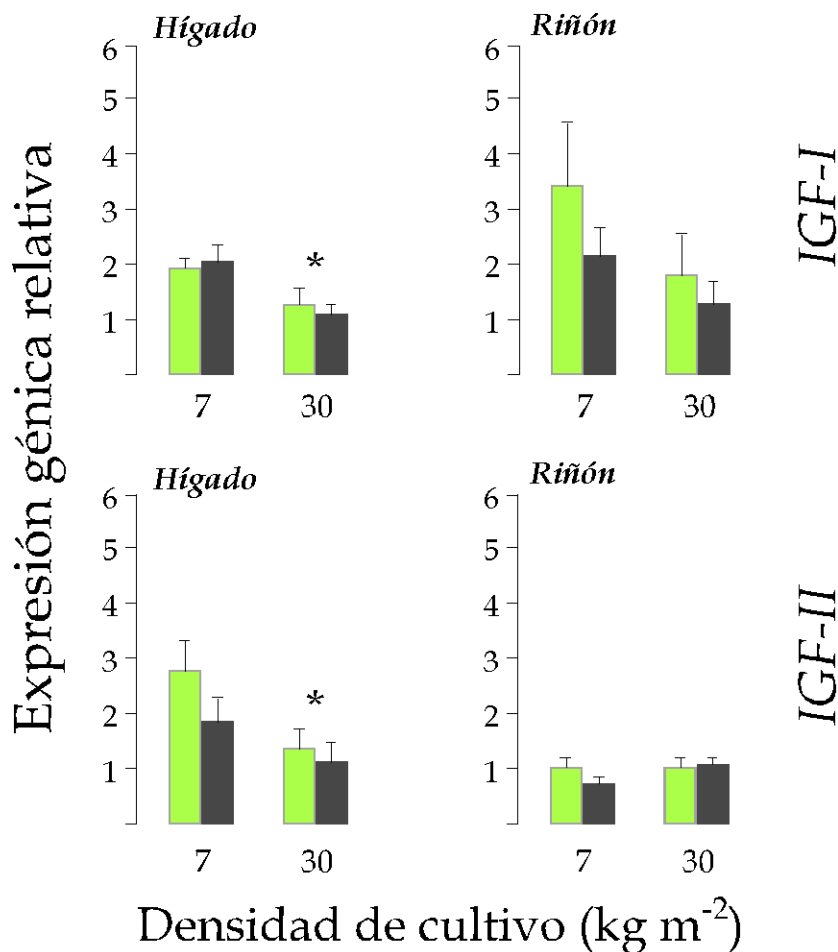


Figura 1. Expresiones relativas de IGF-I e IGF-II en hígado y riñón de lenguados inicialmente estabulados a 7 y 30 kg m⁻² bajo 1,0 (verde) y 0,25 % (negro) de biomasa como ración alimenticia. Los datos son expresados como el valor medio obtenido relativo al grupo calibrador (30 kg m⁻²; 0,25 % biomasa de peces). El asterisco indica diferencias significativas (P < 0,05) entre densidades de cultivo.

a.2) Expresión génica de HSPs

Los niveles de ARNm correspondientes a HSP70 disminuyeron significativamente para la densidad más alta tanto en hígado como en riñón (Figura 2). No se observaron diferencias asociadas al régimen alimenticio (P > 0,05). Además, una interacción significativa (P_{interacción} = 0,0042) entre densidad de cultivo y ración alimenticia fue encontrada en este último órgano tras análisis ANOVA de dos vías.

No se detectaron transcritos de HSP90 en hígado para ninguna densidad o régimen alimenticio. Así mismo, en riñón tampoco se encontraron diferencias en relación a los niveles de ARNm entre condiciones de carga o raciones alimenticias (P > 0,05) (Figura 2).

a.3) Expresión génica de lisozima tipo-g y HAMP1

Los transcritos de lisozima tipo-g disminuyeron significativamente ($P < 0,05$) en individuos cultivados a alta densidad (promedio de 1,7 y 1,6 veces en hígado y riñón, respectivamente). Además, los niveles de ARNm correspondientes a la lisozima tipo-g también se redujeron ($P < 0,05$) con la ración alimenticia más baja tanto en hígado como en riñón (promedio de 2,4 y 1,5 veces, respectivamente) (Figura 3).

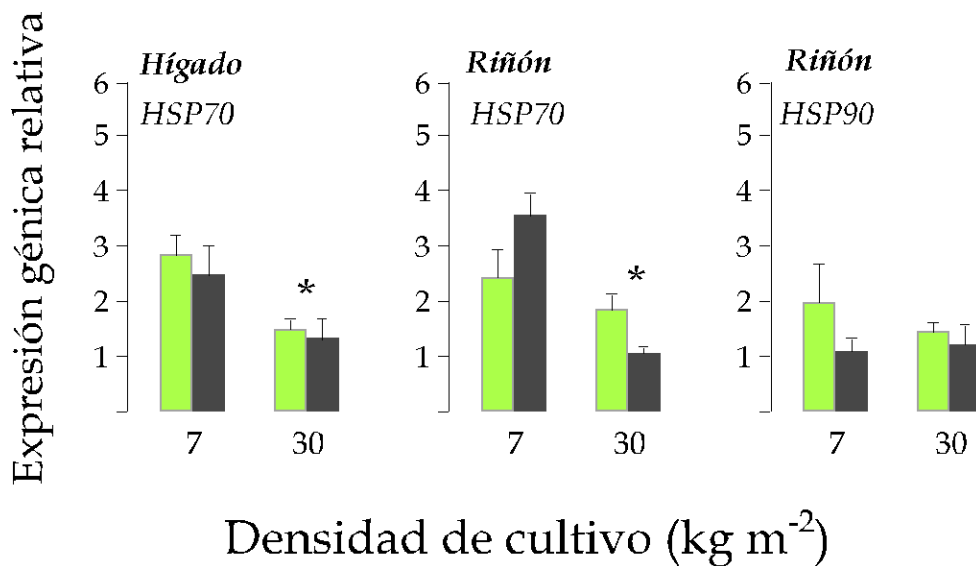


Figura 2. Expresiones relativas de HSP70 y HSP90 en hígado y riñón de lenguados inicialmente estabulados a 7 y 30 kg m⁻² bajo 1.0 (verde) y 0.25 % (negro) de biomasa como ración alimenticia. Los datos son expresados como el valor medio obtenido relativo al grupo calibrador (30 kg m⁻²; 0,25 % biomasa de peces). Transcritos de ARNm de HSP90 no fueron amplificados (N/A) en hígado. Los valores de expresión relativa de HSP90 en hígado fueron obtenidos a partir de 100 n de muestra de ARN original. El asterisco indica diferencias significativas ($P < 0,05$) entre densidades de cultivo.

Los niveles de transcritos de HAMP1 disminuyeron significativamente en hígados de animales cultivados a 30 kg m⁻² (~5 veces). Así mismo, la expresión de este gen se vio afectada ($P < 0,05$) por la ración alimenticia tanto en hígado como en riñón. Los niveles de expresión fueron comparables con aquellos obtenidos en la condición 7 kg m⁻² y 0,25 % de biomasa. Finalmente, una clara interacción ($P_{\text{interacción}} = 0.0001$) entre densidad de cultivo y régimen alimenticio fue observada en hígado al analizar la expresión génica de HAMP1.

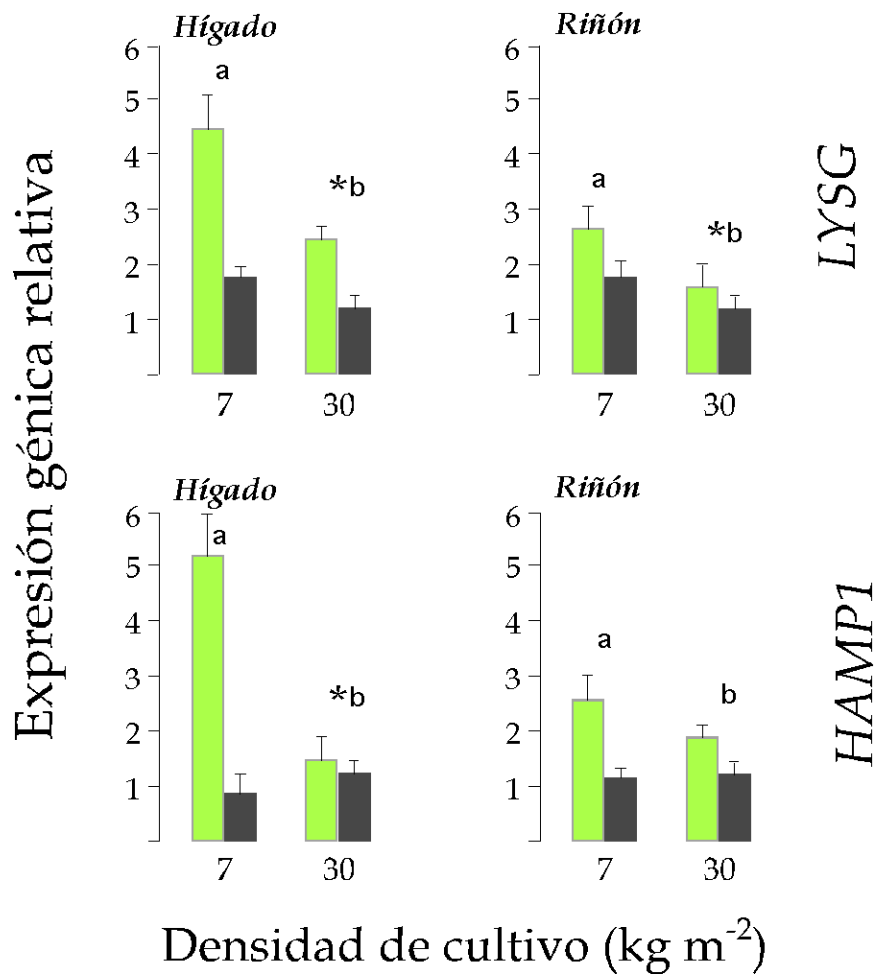


Figura 3. Expresiones relativas de lisozima tipo-g y HAMP1 en hígado y riñón de lenguados inicialmente estabulados a 7 y 30 kg m⁻² bajo 1,0 (verde) y 0,25 % (negro) de biomasa como ración alimenticia. Los datos son expresados como el valor medio obtenido relativo al grupo calibrador (30 kg m⁻²; 0,25 % biomasa de peces). El asterisco indica diferencias significativas (P < 0,05) entre densidades de cultivo. Letras distintas representan diferencias significativas causadas por la ración alimenticia.

Para el objetivo 4:

a) Caracterización de los parámetros físico-químicos

Radiación fotosintéticamente activa (*PAR*), temperatura y oxígeno disuelto fueron las variables estudiadas. La Figura 1A muestra el valor promedio (diario) de *PAR* ($4,22 \pm 0,61 \text{ MJ m}^{-2} \text{ d}^{-1}$) a lo largo de los 15 días previos a que aparecieran mortalidades en el estanque *GBD*. La figura 1B muestra la media del perfil *PAR* diario, con valores máximos entre las 13:30 y 16:00 h. Las temperaturas medias registradas en los estanques *GBD* y control fueron $18,3 \pm 0,3 \text{ }^\circ\text{C}$ y $15,6 \pm 0,3 \text{ }^\circ\text{C}$, respectivamente. En el estanque control, la saturación de oxígeno disuelto a lo largo del día varió desde 50,7 a 132,0 % con un valor medio de $79,9 \pm 23,4 \text{ } \%$ (Figura 1C). En cambio, el ciclo diario de saturación de oxígeno en el estanque hiperóxico varió desde 95,2 a 361,0 %, con un valor medio diario de $223,3 \pm 91,8 \text{ } \%$. En el estanque hiperóxico, el oxígeno casi siempre (incluyendo las horas nocturnas) se mantuvo por encima del nivel de saturación.

b) Sintomatología del Síndrome de la Burbuja de Gas (GBD)

Una exoftalmia crónica (ojos saltones) fue el primer y más característico síntoma observado en lenguados afectados por *GBD*, debido a la aparición de burbujas en las zonas retrobulbares y perioculares (Figura 2A). En su estado agudo, las burbujas comprimidas en las zonas próximas a los tejidos llevó a la degeneración de estos y a la aparición de "cataratas". El segundo síntoma visible para la detección precoz de brotes de *GBD* es la aparición de burbujas bajo la piel. Debido a su baja resistencia al gas, la zona del opérculo (región cefálica en general) así como aletas caudal y dorsales constituyen lugares comunes para la aparición de burbujas (Figura 2B). Además de los síntomas visibles de *GBD*, también se observaron varias lesiones letales en los animales. Burbujas en branquias, las cuales varían su color hacia un intenso rojo carmín, provocó una obstrucción de las laminillas (Figura 2C) y, por tanto, la asfixia. La alta presión de gas en el interior de dichas laminillas fue responsable de la deformación de estas (Figura no mostrada), causando en último término la rotura del tejido branquial. De esta forma, tanto asfixia como rotura de tejidos podrían considerarse como las principales causas de la muerte por este síndrome. Así mismo, en lenguados afectados también se pudieron observar hemorragias (Figura 2D). En animales sujetos a condiciones hiperóxicas también pudieron observarse cambios de comportamiento, incluyendo natación errática y pérdida de orientación.

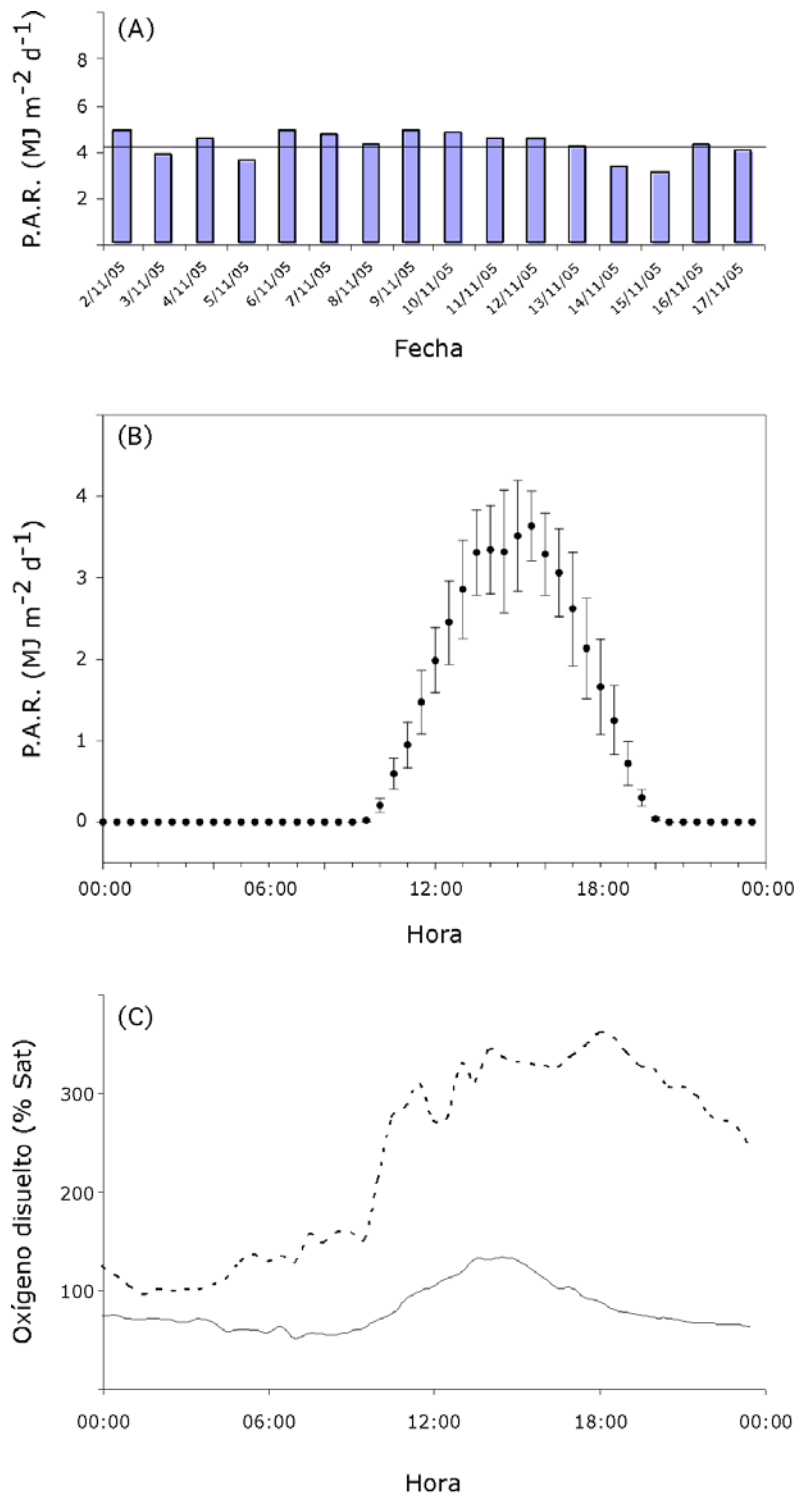


Figura 1. Evolución de la radiación fotosintéticamente activa (*PAR*) durante los 15 días previos al brote de *GBD* (A), perfil promedio del *PAR* diario (B) y niveles de oxígeno disuelto a lo largo de un ciclo diario en el estanque control (*línea continua*) y en el estanque *GBD* (*línea de puntos*) (C)

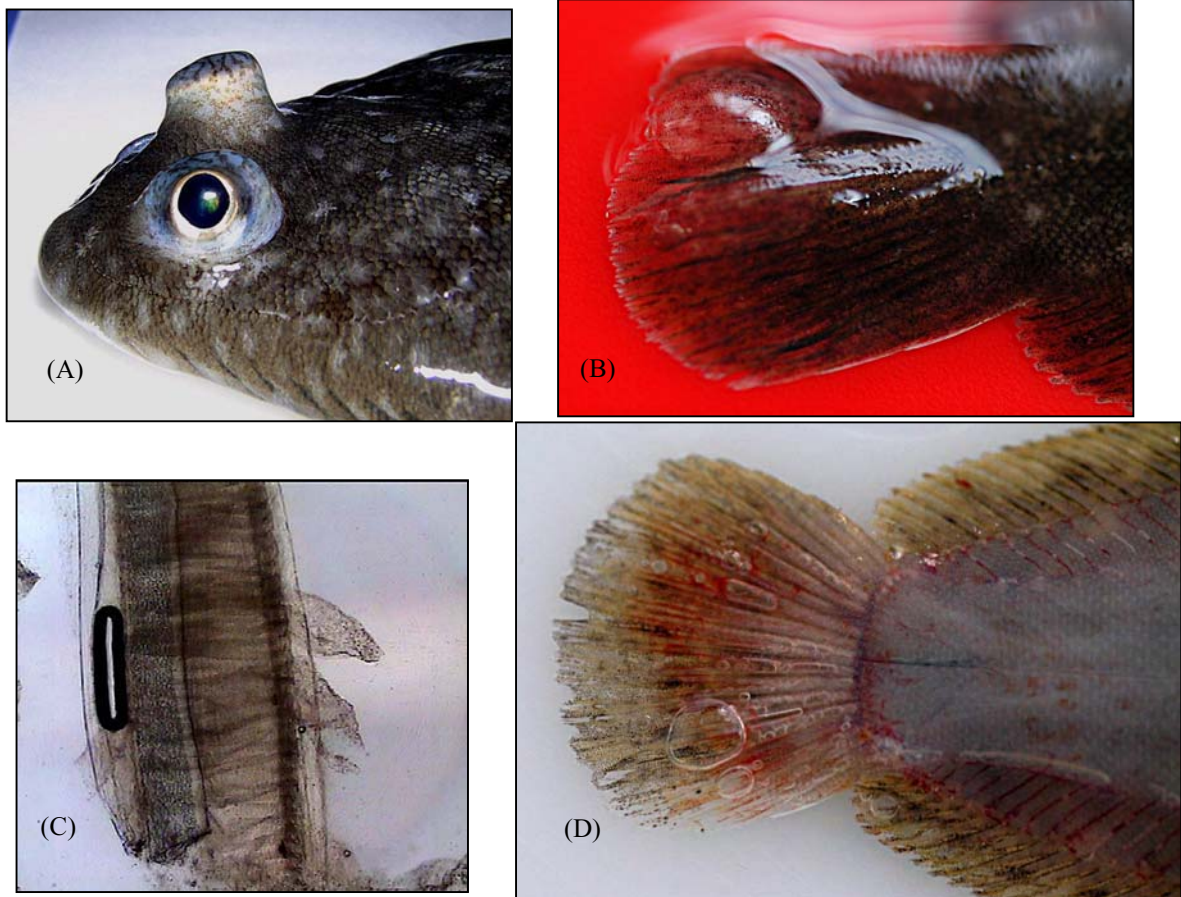


Figura 2. Síntomas visibles observados en lenguados afectados por *GBD*: exoftalmia causada por burbujas retrobulbares (A), burbuja de grandes dimensiones localizada en la aleta caudal (B), burbuja obstruyendo una laminilla branquial (C), y múltiples hemorragias y burbujas en lado ciego (D)

c) Perfiles de expresión de proteínas en hígado y branquias de lenguado

Tras optimizar las condiciones de extracción de proteínas, separación y carga de gel, se analizaron las proteínas citosólicas obtenidas a partir de los extractos de hígado y branquias correspondientes a los tres "pools" de *S. senegalensis* descritos anteriormente. Un total de 1525 y 1632 manchas fueron encontradas en los 4 geles de branquias e hígados realizados para cada uno de los tres estados de salud estudiados. Sus pI se encontraron en el intervalo 4 – 7 y sus pesos moleculares entre 6,5 – 205 kDa.

En branquias, 205 manchas citosólicas se expresaron de manera diferencial según el estado de salud. De estas, 25 fueron seleccionadas para su posible identificación mediante análisis de espectrofotometría de masas (MS). Este pequeño número de proteínas excluían manchas de baja intensidad, muy próximas a otras en el gel, o muy variable en los geles replicados. La Figura 3 (1)

muestra un gel “maestro” donde se observan las 1525 manchas detectadas en los 12 geles originados a partir de las branquias de individuos con los tres estados de salud estudiados y las 25 proteínas seleccionadas. La figura 3 (2) muestra las intensidades relativas de las proteínas indicadas en el gel maestro.

De las 1632 proteínas hepáticas solubles obtenidas de *S. senegalensis*, 498 se expresaron de modo diferencial según el estado de salud. La figura 4 (1) muestra el gel maestro con las 1632 manchas detectadas en los 12 geles obtenidos a partir de los tres estados de salud. De las 498 manchas diferencialmente expresadas, 23 fueron seleccionadas para una posible identificación por MS basándonos en el mismo criterio elegido en el caso de branquias. La figura 4 (2) muestra las intensidades relativas de las proteínas de hígado seleccionadas.

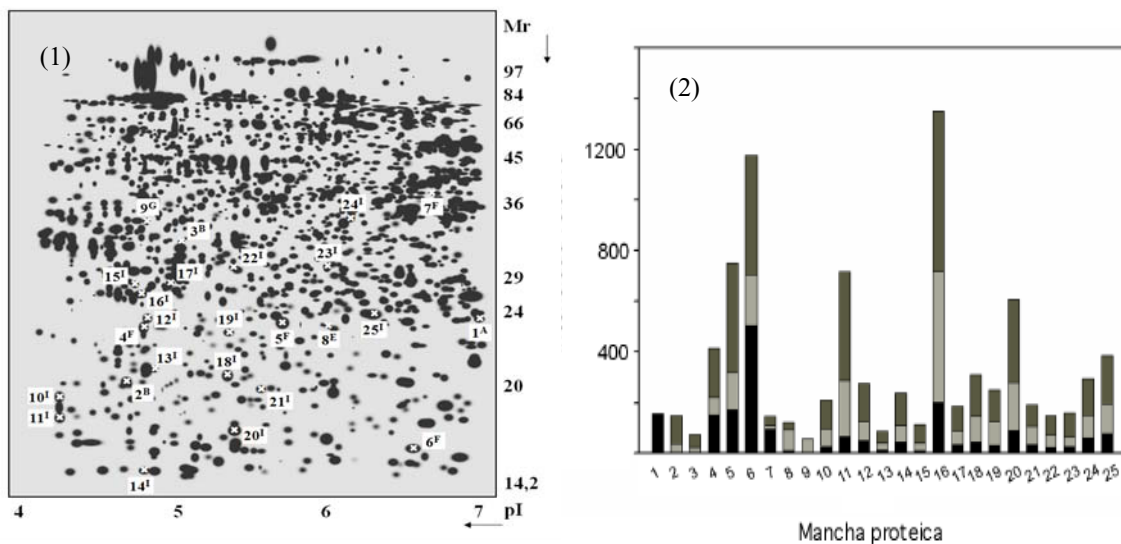


Figura 3. (1) Gel “maestro” de proteínas citosólicas con 25 manchas características de seis tipos de expresión: (A) solo presente y (B) ausente en peces sanos. (C) Expresión disminuida y aumentada (D) en peces bajo hiperoxia asintomáticos. (E) Solo presentes en peces afectados con síntomas externos. (F) Incrementada en peces afectados con síntomas externos. (2) Intensidades relativas de proteínas incluidas en el gel “maestro” para los tres estados estudiados: peces control sanos (negro); peces bajo hiperoxia sin síntomas externos (gris claro); peces afectados por *GBD* con síntomas externos (gris oscuro)

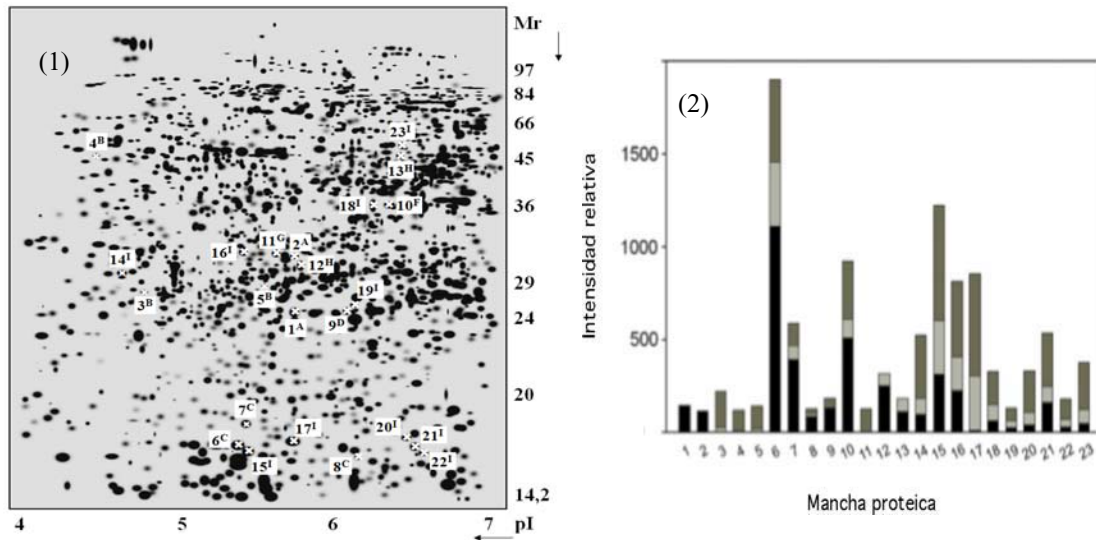


Figura 4. (1) Gel "maestro" de proteínas citosólicas de hígado con 23 manchas características de ocho tipos de expresión: (A) presente, (B) ausente e (C) incrementada en peces sanos control. (D) Ausente y (E) disminuida en peces afectados sin síntomas externos. (F) Presente, (G) ausente e (H) incrementada en peces afectados con síntomas externos. (2) Intensidades relativas de proteínas incluidas en el gel "maestro" para los tres estados estudiados: peces control sanos (negro); peces bajo hiperoxia sin síntomas externos (gris claro); peces afectados por GBD con síntomas externos (gris oscuro).

d) Identificación de proteínas expresadas diferencialmente

Ninguna de las manchas proteicas extraídas fueron identificadas mediante análisis MALDI-TOF tras búsqueda informática de todas las secuencias depositadas en las bases de datos públicas. Por tanto, se procedió a la identificación mediante secuenciación "de novo" de los péptidos separados por MALDI-TOF, usando espectrofotometría de masas tándem (nESI-IT MS/MS).

La tabla II muestra las 8 proteínas identificadas en branquias mediante búsqueda de homología usando el algoritmo BLAST. La mayoría de las proteínas identificadas en branquias (50 %) son constituyentes del citoesqueleto o están implicadas en la motilidad (β -ACT, β -TBB, α -TPM, MLC1). Otras tres (37,5 %) tienen papeles regulatorios (CaM; RKIP, dos manchas), mientras que una (12,5 %) está implicada en la generación de energía a partir de carbohidratos (Gliceraldehído 3-P deshidrogenasa (GAPDH)). Sorprendentemente, dos proteínas diferentes pero relacionadas fueron identificadas a partir de la mancha 16: α -TPM (tres péptidos) y MLC1 (tres péptidos). En hígado, además de la HBB, implicada en el transporte de oxígeno, otras proteínas relacionadas con el

transporte de lípidos (FABP), metabolismo de carbohidratos (DCXR) y aminoácidos (GNMT), y sistema del complemento (C3) fueron identificadas.

Tabla II. Proteínas expresadas diferencialmente e identificadas por nESI-IT MS/MS tras búsqueda en las bases de datos. ^aPerfil de expresión: ausente (B) o incrementada (C) en peces sanos; incrementada (E) o disminuida (F) en animales afectados sin síntomas; incrementada en peces afectados con síntomas externos (I). ^bNúmero GI, genInfo identificador del NCBI. ^cValor-E, número de alineaciones con probabilidades equivalentes o superiores a los esperados por búsqueda al azar en las bases de datos.

Mancha	Perfil ^a	Proteína homóloga (Organismo)	^b Número GI	M _r (kDa)/pI		Secuencias peptídicas	^c Valor-E NCBI ^c	Función propuesta
				Teor.	Exper.			
Proteínas identificadas en Branquias								
3	B	Beta-actina, β-ACT (<i>Solea senegalensis</i>)	94537157	41.7/5.4	31.8/5.0	VAPEEHPV LLTEAPLN PK GYSFTTTA ER AVFPSIVG RPR HQGVMVG MGQK	1e-10 6e-03 2e-05 5e-06	Proteína del citoesqueleto implicada en la movilidad celular interna
5	F	Proteína inhibidora de la Raf quinasa, RKIP. Proteína de unión a fosfatidil-etanolamina, PEBP (<i>Salmo salar</i>)	197632225	20.7/5.6	22.7/5.8	YGSVEIDEL GK SGCVLSDY VGSG	0.033 4e-03	Los miembros de esta familia intervienen en la unión de lípidos, en el desarrollo neuronal, la inhibición de la serina proteasa, y en la regulación de varias rutas de señalización como la MAP quinasa y la NF-κB.
8	E	Proteína inhibidora de la Raf quinasa, RKIP. Proteína de unión a fosfatidil-etanolamina, PEBP (<i>Salmo salar</i>)	197632225	20.7/5.6	22.7/6.1	YGSVEIDE LGK	0.033	
11	I	Calmodulina, CaM (<i>Oreochromis mossambicus</i>)	78099193	16.8/4.1	17.3/4.1	EAFSLFDKD GDGTITTK VFDKDGNG YISAAELR DGNGYISAA ELR MKDTDSEE EIR DTDSEEEI REAFR	7e-09 4e-08 4e-04 4e-04 9e-06	Interviene en el control por Ca ²⁺ de muchas enzimas y proteínas

12	I	Beta-tubulina, β -TBB (<i>Pseudopleuronectes americanus</i>)	1820261 2	49.8/4.8	22.9/4.8	AVLVDLEP GTMDSVR	3e-09	Los microtúbulos son polímeros de tubulina, un dímero de dos subunidades, alfa y beta.	
16	I	Cadena ligera de la miosina 1, MLC1 (<i>Thunnus thynnus</i>) Alfa-tropomiosina, α -TMP (<i>Danio rerio</i>)	7678720 5596254 4	21.3/4.7 32.7/4.7	26.0/4.9	VFDKEGNG TVMGAELR IVLSTLGEK VAYNQIADI MR LEEAEKAAD ESER HIAEEADRK YEEVAR QLEDDLVAL QK	3e-08 0.42 3e-04 5e-05 1e-07 2e-03	Análoga a la calmodulina (EF-hands), une Ca^{2+} regulando la actividad miosina Bloquea los sitios de unión de la miosina en los filamentos de actina. La unión de Ca^{2+} a la troponina C desplaza la tropomiosina y libera los sitios de unión de la miosina, promoviendo la contracción muscular.	
22	I	Beta-actina, β -ACT (<i>Solea senegalensis</i>)	9453715 7	41.7/5.4	29.3/5.4	VAPEEHPVL LTEAPLNPK AGFAGDDA PR AVFPSIVG RPR	1e-10 4e-04 2e-05	Proteína del citoesqueleto implicada en la movilidad celular interna	
24	I	Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa, GAPDH (<i>Solea senegalensis</i>)	1442261 79	36.0/8.2	34.7/6.2	VPTPNVSV VDLTVR	5e-08	La GAPDH juega un papel fundamental en la glucólisis y gluconeogénesis.	
Proteínas identificadas en Hígado									
3	B	Beta-globina, HBB (<i>Scophthalmus maximus</i>)	1164880 92	15.9/5.2	28.4/4.9	LHVDPDNFR	3e-04	Proteína que contiene un grupo hemo y que interviene en la unión y transporte de oxígeno	
6	C	Proteína de unión a ácidos grasos, FABP (<i>Solea senegalensis</i>)	1567118 43	15.0/5.6	17.0/5.5	FQLNEPFDE TTADDR FQLNEPFDE TTADDRK	6e-10 7e-11	Transporte de intermediarios metabólicos hidrofóbicos y transporte de lípidos entre membranas	
14	I	Componente del complemento C3, C3 (<i>Paralichthys olivaceus</i>)	6682835	184.7/6.1	30.2/4.7	LPYSAVRGE QLEIK SVPFIIPMK	3e-08 2e-04	Forma parte del sistema del complemento de vertebrados, que está compuesto por muchas proteínas	

									plasmáticas distintas. Integrante de los sistemas inmunes adquirido e innato.
16	I	Dicarbonil/L-xilulosa reductasa, DCXR (<i>Danio rerio</i>)	6295520 7	25.8/7.6	32.0/5.5	GTGGSIVNV SSQASQCAL K	9e-10 8e-07		Implicado en el ciclo del uronato del metabolismo de la glucosa.
						VNSVNPTVV MTEMGR			
18	I	Glicina N-metiltransferasa, GNMT (<i>Danio rerio</i>)	4708640 5	33.2/6.4	35.7/6.2	SLGVAAEGL PDQYADGK	2e-05		Interviene en el metabolismo de la glicina, serina y treonina

2.5.B3. CONCLUSIONES

Para el objetivo 1:

No se encontró ningún efecto negativo en lo referente a parámetros de crecimiento o dispersión de tamaño cuando los animales fueron cultivados en el intervalo de 30 - 45 kg m⁻² en relación a las otras condiciones de carga menores estudiadas.

El aumento de la actividad alimenticia de los animales mostrado bajo altas densidades de cultivo equilibra el mayor gasto metabólico de estos bajo dichas condiciones, evitando una disminución de los parámetros de crecimiento.

Su tendencia natural a agruparse en los tanques de cultivo, la ausencia de agresividad y el no establecimiento de jerarquías basadas en tamaño en relación a su comportamiento alimenticio, son hechos importantes que apoyan el cultivo de esta especie bajo condiciones intensivas.

Para el objetivo 2:

Ya que no se encontraron diferencias en términos de crecimiento en individuos situados en el intervalo 50 – 400 g, esta etapa de engorde ha de ser considerada como una fase homogénea, esto es, con una única pendiente de crecimiento.

La clasificación de grupos de lenguados cultivados según su tamaño o su crecimiento previo no mejoró los parámetros de crecimiento mostrados por los grupos de lenguados sin clasificar. La heterogeneidad del grupo mejora el crecimiento poblacional, debido a una ordenación social más eficiente.

Debe asumirse que el establecimiento de jerarquías es un hecho inherente de toda población cultivada de *S. Senegalensis*.

El tamaño del pez no es el factor que dirige las jerarquías en grupos cultivados de *S. Senegalensis*. La dispersión de tamaño en poblaciones cautivas es solo el efecto observable de poseer un alto, medio o bajo conjunto de características en lugar de ser la causa en sí misma de su "status" social.

El establecimiento de la estructura social es altamente independiente de las condiciones externas, siendo consecuencia fundamentalmente de las relaciones que tienen lugar entre los propios individuos que constituyen el grupo cultivado.

Para el objetivo 3:

La no diferencia en términos de crecimiento entre lenguados cultivados a alta y baja densidad, independientemente del régimen alimenticio, confirma la posibilidad de cultivar la especie *S. senegalensis* bajo altas condiciones de carga sin riesgo de disminuir los parámetros productivos.

Las *IGFs* han de poseer una función diferente de la estrictamente relacionada con el crecimiento somático, ya que sus niveles se vieron afectados por la densidades de cultivo (donde no se observaron diferencias en *SGR*) en lugar de por el régimen alimenticio el cual promovió importantes cambios en los valores de crecimiento.

No se puede constatar la existencia de estrés celular en individuos estabulados bajo condiciones de "crowding" después de 60 días de cultivo, según se desprende de los resultados obtenidos en la expresión de *HSPs*.

La reducción de los niveles de ARNm en los indicadores del sistema inmune innato, lisozima tipo-g y HAMP1, en animales cultivados bajo altas condiciones de carga podrían ser indicativos de la supresión de dicho sistema inmune, explicando así la alta susceptibilidad a enfermedades por parte de lenguados cultivados de modo intensivo durante su fase de engorde.

Para el objetivo 4:

La aparición de brotes de *GBD* en estanques de tierra es consecuencia del establecimiento de un perfil diario de oxígeno sin fase de desaturación (> 100 % saturación), provocado por el dominio en el sistema de una biomasa de macroalgas originada por una escasa renovación de agua.

Una exoftalmia crónica (ojos saltones) y la aparición de burbujas en la región cefálica y aletas pueden ser considerados los dos síntomas más característicos de *GBD* en *S. senegalensis*, pudiendo permitir la identificación de estos la detección temprana de este síndrome.

Tanto la asfixia causada por la obstrucción física de burbujas en las laminillas branquiales como la posterior rotura tisular de estas, pueden ser considerados los principales motivos de mortalidad causados por *GBD*.

La mayoría de las proteínas identificadas en branquias se encuentran relacionadas con la alteración oxidativa del citoesqueleto, ya sea directamente en su estructura/función, motilidad o regulación, reflejando así el papel de este tejido en el intercambio de oxígeno.

La mayoría de las proteínas identificadas en hígado se encuentran relacionadas con el daño oxidativo, protección frente a estrés oxidativo y respuesta inflamatoria, de acuerdo con el papel metabólico predominante de este órgano.

Debido a que se ha demostrado que condiciones hiperóxicas inducen de modo altamente específico la formación de dímeros de *HBB*, y la determinación de estos puede ser realizada de manera rutinaria, se propone dicho dímero de *HBB* como potencial biomarcador de ambientes altamente hiperóxicos inductores de brotes de *GBD*.

2.6.B3. VALORACIÓN

El efecto de la densidad de cultivo sobre el crecimiento ha sido materia de estudio en algunas de las especies comerciales más importantes. La constatación que *S. senegalensis* puede ser cultivada bajo densidades 30 – 45 kg m⁻² sin afectación del crecimiento, al menos durante una fase de engorde avanzado (70 g en adelante), constituye un avance considerable para su cultivo intensivo.

Así mismo, la información aportada en este trabajo referente a los efectos del “crowding” sobre las interacciones sociales del lenguado, su influencia en el hábito de la alimentación así como en el gasto metabólico asociado, permite aumentar el conocimiento en una condición de cultivo clave como es la densidad de cultivo.

Solea senegalensis es un pez que no exhibe un comportamiento agresivo en cautividad y, por tanto, los mecanismos que llevan a crear su estructura social son de este modo menos aparente. Precisamente este trabajo incrementa el conocimiento relativo a las poblaciones cultivadas de esta especie, revelando cómo características de la misma (tamaño del individuo, tamaño de la población...) afectan al crecimiento y a la ordenación social. Así mismo, verifica la capacidad de la población para modificar su distribución de crecimiento en respuesta tanto al grado de homogeneidad del grupo cultivado como a las condiciones de cultivo, mejorando el entendimiento de los mecanismos implicados en la alta dispersión de tamaño comúnmente encontrados en las poblaciones cultivadas de lenguado.

Por otro lado, la separación de peces según tamaño es una práctica rutinaria en las instalaciones de engorde intensivo de juveniles. Según los resultados obtenidos en este trabajo, tales prácticas de reordenación implicarían una homogeneización de la población que podría dificultar la ordenación social pudiendo afectar a la producción global.

La densidad de cultivo es un aspecto de gran importancia en acuicultura ya que puede afectar al crecimiento, bienestar y salud de los animales. En peces planos los datos relacionados con el crecimiento son contradictorios. Una primera parte interesante dentro de este trabajo es confirmar la ausencia de efecto en los parámetros de producción del intervalo 30 – 45 kg m⁻², tal y como ya se ha observado en trabajos anteriores (Salas-Leiton et al., 2008).

De modo similar al crecimiento, la densidad de cultivo puede llegar a afectar algunos parámetros fisiológicos. Precisamente este trabajo revela, según los resultados obtenidos en los marcadores moleculares del sistema inmune innato, la posible existencia de una inmunodepresión severa en lenguados cultivados bajo altas condiciones de carga. La recuperación de los niveles de estos marcadores debe considerarse como un objetivo próximo, permitiendo así el cultivo intensivo de esta especie con mayores garantías inmunológicas.

El lenguado senegalés (*Solea senegalensis*) es un pez plano soleído cuyo cultivo extensivo en estanques de tierra es común tanto en el Sur de España como en Portugal. En estanques abiertos, la probabilidad de alcanzar condiciones de sobresaturación de oxígeno debido a los productores primarios es alta. La sobreproducción de oxígeno fotosintético en estanques acuícolas es un factor de riesgo y preocupación, particularmente cuando son consideradas especies como el lenguado, que exhibe un hábito bentónico y nocturno. De este modo, caracterizar las condiciones físico-químicas que llevan a la aparición de brotes de *GBD* resulta especialmente interesante. Así mismo, conocer de manera detallada la sintomatología causada por *GBD* en *S. senegalensis*, puede facilitar la detección precoz de este síndrome evitando así importantes pérdidas económicas.

Por otro lado, el uso del oxígeno es una práctica común tanto en el transporte como en el cultivo intensivo de peces, permitiendo el uso de altas condiciones de carga. A partir de herramientas proteómicas, este trabajo aumenta el conocimiento básico acerca del estrés oxidativo, particularmente de las proteínas diana implicadas en el daño oxidativo, que tiene lugar durante las condiciones hiperóxicas. Finalmente, de modo especialmente aplicado, tras la identificación de distintas proteínas con un patrón de expresión diferencial, este trabajo propone un biomarcador específico (dímeros de *HBB*) para la identificación de las condiciones hiperóxicas responsables de la inducción de brotes de *GBD*.

2.7.B3. DIFUSIÓN

Del objetivo 1:

Publicación:

Salas-Leiton, E., Anguís, V., Manchado, M., Cañavate, J.P., 2008. Growth, feeding and oxygen consumption of Senegalese sole (*Solea senegalensis*) juveniles stocked at different densities. *Aquaculture* 285, 84-89

Presentación oral:

Production and physiological parameters related to stocking density. E. Salas-Leiton, V. Anguís, M. Manchado, J.P. Cañavate. IV Sole Workshop. 11-13 Nov 2008, Faro (Portugal)

Del objetivo 2:

Publicación escrita:

Salas-Leiton, E., Anguís, V., Rodriguez-Rua, A., Cañavate, J.P. Growth of juvenile Senegalese sole (*Solea senegalensis*) after grading according to individual size and growth rate. (En revision.)

Del objetivo 3:

Presentación oral:

Production and physiological parameters related to stocking density. E. Salas-Leiton, V. Anguís, M. Manchado, J.P. Cañavate. IV Sole Workshop. 11-13 Nov 2008, Faro (Portugal)

Del objetivo 4:

Publicación:

Salas-Leiton, E., Cánovas-Conesa, B., Zerolo, R., López-Barea, J., Cañavate, J.P. Alhama, J. 2009. Proteomics of juvenile Senegal sole (*Solea senegalensis*) affected by Gas Bubble Disease in hyperoxigenated ponds. Marine Biotechnology. doi: 10.1007/S10126-008-9168-8

Presentación Oral:

Gas Bubble Disease and associated stress biomarkers in *Solea senegalensis*. E. Salas-Leiton, R. Zerolo, B. Cánovas-Conesa, J. Alhama, J. López-Barea, J.P. Cañavate. CD Abstracts European and World Congress Aqua 2006, Florencia, Italia, p. 252

2.8.B3. INCIDENCIAS DE DESARROLLO

2.9.B3. BIBLIOGRAFÍA

Del objetivo 1:

Alanärä A. y Brännäs, E. 1996. Dominance in demand-feeding behaviour in Arctic charr and rainbow trout: the effect of stocking density. J. Fish Biol. 48, 242-254

- Boujard, T., Labbé, L., Aupérin, B., 2002. Feeding behaviour, energy expenditure and growth of rainbow trout in relation to stocking density and food accessibility. *Aquacult. Res.* 33, 1233–1242
- Brett, J.R., 1979. Environmental factors and growth. En: Hoar, W.S., Randall, D.J., Brett, J.R. (Eds.), *Fish Physiology*, Vol. 8. Academic Press, New York, pp. 599-675
- Duarte, S., Reig, L., Oca, J., Sánchez, P., Ambrosio, P.P., Flos, R., 2006. Behavioural responses of an heterogeneous size sole *Solea senegalensis* population at two different stocking densities. En *Abstracts Aquaculture Europe Congress 2006*. Pág. 266. Florencia (Italia)
- Engrola, S., Caçao, P., Conceiçao, L.E.C., Dinis, M.T., 2001. Ongrowing of Senegal sole (*Solea senegalensis*) juveniles at different densities. En *Libro de Abstracts de Aquaculture 2001 WAS conference*, Lake Buena Vista, Florida, USA, 21-25.
- Howell, B.R., 1998. The effect of stocking density on growth and size variation in cultured turbot and sole. *ICES CM* 1998/L:10.
- Martínez-Tapia, C., Fernández-Pato, C.A., 1991. Influence of stock density on turbot (*Scophthalmus maximus L.*) growth. *ICES CM* 1991/F:20
- Merino, G.E., Piedrahita, R.H., Conklin, D.E., 2007. The effect of fish stocking density on the growth of California halibut (*Paralichthys californicus*) juveniles. *Aquaculture* 265, 176-186
- Sánchez, P., Ambrosio, P.P., Flos, R., 2007. Stocking density and growth performance of Senegalese sole (*Solea senegalensis*). Preliminary results. En *CD Abstracts Aquaculture Europe Congress 2007*, pp. 503-04. Estambul (Turquía)
- Schram, E., Van der Heul, J.W., Kamstra, A., Verdegen, M.C.J., 2006. Stocking density-dependent growth of Dover sole (*Solea solea*). *Aquaculture* 252, 339 – 347

Del objetivo 2:

- Brett, J.R., 1979. Environmental factors and growth. En: Hoar, W.S., Randall, D.J., Brett, J.R. (Eds.), *Fish Physiology*, Vol. 8. Academic Press, New York, pp. 599-675
- Brown, M.E., 1946. The growth of brown trout (*Salmo trutta L.*). Factors influencing the growth of trout fry. *J. Exp. Biol.* 22, 118-129
- Grand, T.C., Grant, J.W.A., 1994. Spatial predictability of food influences, its monopolisation and defence by juvenile convict cichlids. *Anim. Behav.* 47, 91-100
- Hollis, K.L., Langworthy-Lam, K.S., Blouin, L.A., Romano, M.C., 2004. Novel strategies of subordinate fish competing for food: learning when to fold. *Anim. Behav.* 68, 1155-1164
- Houde, E.D., Schekter R.C., 1981. Growth rates, rations and cohort consumption of marine fish larvae in relation to prey concentrations. *Rapports et Procès-verbaux des Réunions Conseil international pour l'Exploration de la Mer* 178, 441-453
- Jobling, M., 1985. Physiological and social constraints on growth of fish with special reference to Arctic charr, *Salvelinus alpinus L.* *Aquaculture* 44, 83-90
- Koebele, B.P., 1985. Growth and the size hierarchy effect: an experimental assessment of three proposed mechanisms; activity differences, disproportional food acquisition, physiological stress. *Environ. Biol. Fishes* 12, 181-188

Del objetivo 3:

- Costas, B., Aragao, C., Mancera, J.M., Dinis, M.T. Conceiçao, L.E.C., 2008. High stocking density induces crowding stress and affects amino acid metabolism in Senegalese sole *Solea senegalensis* (Kaup 1858) juveniles. *Aquacult. Res.* 39, 1-9
- Gornatti, R., Papis, E., Rimoldi, S., Terova, G., Saroglia, M., Bernardini, G., 2004. Rearing density influences the expression of stress-related genes in sea bass (*Dicentrarchus labrax, L.*) *Gene* 341, 111-118
- Houde, E.D., Schekter R.C., 1981. Growth rates, rations and cohort consumption of marine fish larvae in relation to prey concentrations. *Rapports et Procès-verbaux des Réunions Conseil international pour l'Exploration de la Mer* 178, 441-453
- Iwama, G.K., Thomas, P.T., Forsyth, R.B., Vijayan, M.M., 1998. Heat shock protein expression in fish. *Rev. Fish Biol. Fish.* 8, 35-56

- Jiménez-Cantizano, R.M., Infante, C., Martín-Antonio, B., Ponce, M., Hachero, I., Navas, J.I., Manchado, M., 2008. Molecular characterization, phylogeny, and expression of c-type and g-type lysozymes in brill (*Scophthalmus rhombus*). *Fish Shellfish Immunol.* 25, 57-65
- Livak KJ, Schmittgen TD., 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{(-\Delta\Delta C_T)}$ method. *Methods* 25, 402-408
- Manchado, M., Salas-Leiton, E., Infante, C., Ponce, M., Asensio, E., Crespo, A., Zuasti, E., Cañavate, J.P., 2008. Molecular characterization, gene expression and transcriptional regulation of cytosolic HSP90 genes in the flatfish Senegalese sole (*Solea senegalensis* Kaup). *Gene* 416, 77-84
- Reineke, M., Björnsson, B. Th., Dockhoff, W.W., McCormick, S.D., Navarro, I., Power, D.M., Gutiérrez, J., 2005. Growth hormone and insulin-like growth factors in fish: where we are and where to go. *Gen. Comp. Endocrinol.* 142, 20-24
- Salas-Leiton, E., Anguís, V., Manchado, M., Cañavate, J.P., 2008. Growth, feeding and oxygen consumption of Senegalese sole (*Solea senegalensis*) juveniles stocked at different densities. *Aquaculture* 285, 84-89
- Yada, T., 2007. Growth hormone and fish immune system. *Gen. Comp. Endocrinol.* 152, 353-358

Del objetivo 4:

- López-Barea, J., Gómez-Ariza, J.L., 2006. Environmental proteomics and metallomics. *Proteomics* 6, S51-S62
- Lushchak, V.I., Bagnyukova, T.V., 2006. Effects of different environmental oxygen levels on free radical processes in fish. *Comp. Biochem. Physiol. B* 144, 283-289
- Ritola, O., Tossavainen, K., Kiuru, T., Lindström-Seppä, P., Mölsä, H., 2002a. Effects of continuous and episodic hyperoxia on stress and hepatic glutathione levels in one-summer-old rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *J. Appl. Ichthyol.* 18, 159-164
- Ritola, O., Livingstone, D.R., Peter, L.D., Lindström-Seppä, P., 2002b. Antioxidant processes are affected in juveniles rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) exposed to ozone and oxygen-supersaturated water. *Aquaculture* 210, 1-19
- Roberts, R.J., 1978. Miscellaneous non-infectious diseases. En: Roberts R.J. (ed) *Fish Pathology*. Bailliere Tindhall, Londres, pp. 227-234
- Romero-Ruiz, A., Carrascal, M., Alhama, J., Gómez-Ariza, J.L., Abian, J., López-Barea, J., 2006. Utility of proteomics to assess pollutant response of clams from the Doñana bank of Guadalquivir Estuary (SW Spain). *Proteomics* 6, 245-255
- Speare, D.J., 1990. Histopathology and ultrastructure of ocular lesions associated with gas bubble disease in salmonids. *Comp. Pathol.* 103, 421-432
- Wood, C.M., 1991. Branchial ion and acid-base transfer in freshwater teleost fish: environmental hyperoxia as a probe. *Physiol. Zool.* 64, 68-102

2.1.B4. OBJETIVO INICIAL B.4

B.4. Conocer cambios en la actividad de enzimas metabólicas del lenguado, en respuesta a diferentes condiciones de cultivo.

2.2.B4. OBJETIVOS REALIZADOS

Se han determinado biomarcadores de estrés fisiológico en lenguados. Se han estudiado las fuentes de estrés oxidativo y los sistemas de protección antioxidante en cultivos de juveniles de lenguado. El objetivo es tratar de entender cómo evitar los problemas de oxidación que podrían favorecer patologías y enfermedades, para aumentar el crecimiento y la calidad de vida durante las etapas de crecimiento. Entre los factores de estrés se han estudiado: i) el efecto de contaminantes como el paraquat (herbicida bipyridilo) y el sulfato de cobre. ii) el efecto de cambios de temperatura (crónicos y agudos), iii) el efecto de la interacción entre individuos (densidad de cultivo). Asimismo, se ha estudiado el efecto de la alimentación de los lenguados con distintas dietas (presa viva vs pienso) y el efecto protector frente al estrés oxidativo de dietas suplementadas con vitaminas C (hidrosoluble) y E (liposoluble).

Además de biomarcadores bioquímicos, se ha realizado una aproximación proteómica integral por electroforesis bidimensional acoplada a la secuenciación *de novo* para identificar proteínas con expresión diferencial que respondan a condiciones de estrés oxidativo.

2.3.B4. METODOLOGÍA

1. Organismos y condiciones de cultivo.

La experimentación se realizó en la nave de "cuarentena" del IFAPA Centro "El Toruño", equipada con una bomba de calor para fijar el agua de entrada de los tanques a la temperatura deseada. Así, por la nave circulan dos circuitos paralelos de agua; una de baja temperatura sin paso previo por la bomba de calor y otra de alta temperatura, fijada a 20 °C, y tratada previamente en función de los requerimientos de la experiencia. Se emplearon juveniles de *S. senegalensis* de aproximadamente 100 gr de peso y 18 cm de longitud. Las condiciones de cultivo han sido: tanques, 1/2 m²; T^a, 19-20,5 °C; aireación suave constante; renovación diaria de agua, >300%; salinidad, 32-38 ‰; pH, 8,0-8,2; O₂ disuelto, 85-100% de saturación; alimentación, ≈1-1,5% biomasa total (según demanda). Las medidas de biomarcadores y los estudios proteómicos se han realizado en el Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Universidad de Córdoba. Para las exposiciones se inyectó solución salina, CuSO₄ (2 mg/Kg) y PQ (10 mg/Kg) a peces alimentados con dietas normales, y con dietas suplementadas con vitaminas E y C (1 gr/kg pienso), respectivamente. A los 0, 2, 4, 6 y 8 días se tomaron 4 peces, extrayendo agallas, hígado, riñón, intestino, músculo y sangre.

Para el estudio de la temperatura como factor de estrés se utilizaron juveniles de lenguado, adaptados en cultivo durante 45-60 días a 20°C. Estos peces fueron sometidos a cambios agudos (1 día) ó crónicos (7 días hasta el final del experimento) de temperatura del agua, que se aumentó 5°C hasta alcanzar 25°C ó se enfrió hasta 15°C. El efecto de la temperatura se estudió con dos tipos de dietas: una basada en presa viva (*Nereis virens*, gusano poliqueto) y una dieta comercial (pienso Microback 10). Se hicieron muestreos a 0, 1, 2 y 7 días para estudiar en hígado los biomarcadores.

2. Actividades enzimáticas

El proyecto comenzó optimizando los ensayos de 10 enzimas. Cuatro antioxidativas primarias que eliminan especies reactivas de O₂ (EROs), incluyendo catalasa (KAT, elimina H₂O₂), superóxido dismutasa (SOD, O₂⁻), glutatión peroxidasa Se-dependiente (GPx-Se, H₂O₂) y total (GPx-total, peróxidos orgánicos). Cinco antioxidativas auxiliares que regeneran el poder reductor gastado por las EROs, incluyendo 2 de la vía oxidativa de las pentosas-P, glucosa-6-P- (G6PDH) y 6-P-gluconato (6PGDH) deshidrogenasas, 1 del ciclo de Krebs, isocitrato deshidrogenasa (IDH), 1 glicolítica, gliceraldehído-3-P deshidrogenasa (GAPDH), y la glutatión reductasa (GOR) que reduce glutatión oxidado (GSSG) generado química y/o enzimáticamente con NADPH. Por último, la glutatión transferasa (GST) que cataliza la conjugación del glutatión reducido (GSH) con sustratos electrofílicos y reduce varios hidroperóxidos. Se analizaron también los niveles hepáticos de glutatión, GSH y GSSG. También se ha ensayado el daño en membranas debido al estrés oxidativo, midiendo niveles de malondialdehído (MDA), metabolito derivado del ataque de las EROs a los ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs) presentes en las membranas biológicas. Se ha medido también el nivel de 10 nucleótidos y nucleósidos, centrándonos sobre todo en las concentraciones de AMP, ADP, ATP que permiten calcular la carga energética adenilica (AEC), un parámetro clave del bienestar fisiológico.

Las distintas isoenzimas de la SOD se separaron mediante isoelectroenfoque con un equipamiento PhastSystem (Pharmacia), usando geles con un gradiente de pH 4-6,5 (PhastGel IEF). La tinción *in situ* de la actividad SOD se realizó inmediatamente después de la electroforesis usando NBT, riboflavina y TEMED (Pedrajas *et al*, 1993, 1995). Las actividades enzimáticas se han ensayado en hígados homogenizados (4:1, v:w) en 20 mM fosfato potásico (pH 7) con 1 mM EDTA, PMSF (0,05 gr/ml de acetona) a razón de 0,01 ml/gr y 1 mM GSH. El MDA se midió por fluorescencia en presencia de ácido tiobarbitúrico (TBA) en extractos de hígado homogenizados en tampón 10 mM Tris·HCl (pH 7,5) con 1 mM EDTA, 1 mM GSH y 1 mM PMSF (4:1, v:w).

3. Aproximaciones Proteómicas.

Además de biomarcadores bioquímicos, se hizo una aproximación proteómica integral por electroforesis bidimensional acoplada a la secuenciación

de novo para identificar proteínas con expresión diferencial que respondan a condiciones de estrés oxidativo.

Para la preparación de las fracciones citosólicas, todos los pasos se llevaron a cabo a 4 °C. Los hígados se machacaron con nitrógeno líquido en un mortero de porcelana. Una vez hechos los pool se pesaron aproximadamente 50 mg de cada uno por separado, se homogeneizaron en tampón de extracción, en una proporción de 4:1 (20 mM Tris·HCl pH 7,6; 0,5 M Sacarosa; 0,15 M KCl; 1 mM PMSF; 6 µM Leupeptina; 100 µl/ml de inhibidores de proteasas comerciales de Sigma y 20 mM DTT), con maza de plástico. Se centrifugaron a 4°C (Eppendorf Centrifuge 5415 R) y máximas rpm durante 10'. Al sobrenadante resultante se le añadió benzonasa a razón de 500 U/ml y se incubó durante 30' a temperatura ambiente. Se ultracentrifugó a 50.000 rpm (Optima™ TLX Ultracentrifuge, Beckman, rotor TLA-120.2) durante 1 hora a 4 °C. Se recogió el sobrenadante y se midió la concentración de proteína mediante el método de Bradford (Bio-Rad Protein Assay), usando BSA como patrón.

Para el isoelectroenfoque, una vez optimizada la carga (60 mg de proteína total), se diluyó en un volumen final de 350 µl de tampón de rehidratación (8 M Urea; 0,5% Ampholine™ pH 3,5-10; 2% (w/v) CHAPS; trazas de azul de bromofenol) suplementado con 2,8 mg/ml de DTT. Se incubaron durante 30' a temperatura ambiente, se les dio un pulso de centrifuga para eliminar las burbujas y se cargaron las tiras IPG (18 cm, pH 4-7). Las condiciones de isoelectroenfoque se reflejan en la Tabla 1:

Tabla 1: Programa de isoelectroenfoque

Tiempo	Paso	Voltaje	Rampa
6:00 h	Rehidratación pasiva		
6:00 h	Rehidratación activa	50	Rápida
1:30 h	1	500	Lineal
1:30 h	2	1000	Lineal
1:30 h	3	2000	Lineal
1:30 h	4	4000	Lineal
2:00 h	5	8000	Lineal
hasta 52.000 vh	6	8000	Rápida

Segunda Dimensión. Un paso anterior a la segunda dimensión es el equilibrado de las tiras IPG. Para ello se hace una primera incubación de 15' en agitación con 3 ml/tira de tampón de equilibrado (50 mM Tris·HCl pH 8,8; 6 M Urea; 30% (v/v) Glicerol; 2% (v/v) SDS) suplementado con 10 mg/ml de DTT, con este primer paso se consigue reducir los grupos -SH de los residuos de cisteínas.

En una segunda incubación (15´) con 3 ml de tampón de equilibrado/tira IPG suplementado con 45 mg/ml de yodoacetamida, se metilan los grupos –SH consiguiéndose que las proteínas estén totalmente desnaturalizadas.

La separación mediante electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de SDS (SDS-PAGE) se llevó a cabo a una temperatura de 25 °C. Se emplearon geles (20 x 20,5 cm) de poliacrilamida al 12,5% con el sistema Protean® Plus Multi-Casting Chamber (Bio-Rad) para la polimerización de los geles. Las condiciones eléctricas de la SDS-PAGE fueron 2,5 W/gel durante 5 minutos, para permitir la entrada del frente, y después a 10 W/gel durante aproximadamente 5:30 h (tampón de electroforesis: 0,4 M Tris, 52 mM glicina y 2,8 M SDS), se empleó el sistema Protean® Plus Dodeca™ Cell (Bio-Rad). Los geles se tiñeron con nitrato de plata, el protocolo empleado es una modificación del publicado por Mortz, el cual comprobó que dicha tinción es compatible con el análisis por espectrometría de masas (Mortz *et al*, 2001). La captura de la imagen de los geles se realizó con el escáner GS-800 Calibrated Densitometer (Bio-Rad) y para el análisis de los geles se empleó el software PDQest™ (Bio-Rad).

2.4.B4. RESULTADOS

1. Estrés oxidativo provocado por Cu(II) y PQ: Efecto protector de las vitaminas E y C.

De las 10 enzimas hepáticas relacionadas con la protección frente al estrés oxidativo, sólo 5 mostraron respuesta frente al CuSO₄ y al PQ. La actividad de la G6PDH no se vio afectada en los individuos control (solución salina), no existiendo diferencia alguna entre las tres dietas. El efecto del PQ sobre esta actividad fue más tardío que el del CuSO₄, Su actividad aumentó (247%) pasados 6 días de la exposición a PQ (P < 0,01) y tan sólo 4 (230%) de la exposición a CuSO₄ (P < 0,05). En este último caso, existió un pico máximo de actividad (322%) a los 6 días (P < 0,05) y posteriormente hubo una recuperación de los niveles normales. Las dos vitaminas protegieron frente a los efectos del PQ, en el caso del CuSO₄, fue la vitamina E la más efectiva. En el caso de la actividad 6PGDH, hubo un incremento significativo de la actividad tras 6 días de exposición tanto a PQ (154 %, P < 0,05) como a CuSO₄ (201 %; P < 0,01), siendo la subida provocada por este último mayor. En ambos caso las dos vitaminas ejercieron su acción protectora en igual medida. Otra actividad enzimática que mostró respuesta frente a los tóxicos fue la GOR. En el caso de la exposición a PQ, hubo un aumento brusco de la actividad (309 %) a los 6 días (P < 0,01), las dos vitaminas contrarrestaron esta subida en igual medida. La respuesta frente al CuSO₄ fue mucho más clara, hubo un aumento progresivo de la actividad conforme iban pasando los días, el máximo de actividad ocurrió a los 6 días (404 %; P < 0,05). Las dos vitaminas estudiadas protegen frente al CuSO₄, aunque la vitamina E protege en mayor medida.

La actividad GST se vio alterada con la administración de la solución salina, protegiendo las vitaminas a partir del sexto día del experimento. Los

efectos de los tóxicos sobre esta actividad se vieron a partir de dicho día. En el caso de la administración de PQ, hubo un incremento de la actividad (390 %) pasados 6 días ($P < 0,01$) del que protegieron las dos vitaminas, aunque el efecto protector de la vitamina E fue mayor. En cuanto a los efectos provocados por el CuSO_4 , el incremento de la actividad GST se mantuvo desde pasados 6 días (357 %; $P < 0,001$) de la exposición hasta el final del experimento (346 %; $P < 0,001$), este incremento se vio contrarrestado por las dos vitaminas, aunque fue la vitamina E la más efectiva. La actividad KAT resultó alterada tras el pinchazo de solución salina, disminuyéndose su actividad sobre todo a tiempos cortos. Éste efecto se vio contrarrestado por la vitamina C a tiempos cortos y por la vitamina E a tiempos largos. Pasados 2 días de la exposición a PQ hubo un pico en la actividad (51%) que fue eliminado por la vitamina C, sin embargo, a partir del cuarto día hubo una disminución en la actividad que no fue contrarrestado por ninguna de las dos vitaminas. La exposición a CuSO_4 produjo un descenso de la actividad KAT pasados cuatro días ($P < 0,05$), la vitamina E fue más efectiva que la vitamina C en su acción protectora.

El estado redox del glutatión fue expresado como $2x\text{GSSG}/\text{GSH}$. La manipulación de los individuos con el fin de inyectarles solución salina, produjo una disminución significativa de los niveles de GSH, efecto que fue contrarrestado por la vitamina E. Bajo estas mismas condiciones apenas hubo cambio en los niveles de GSSG, sin embargo, en aquellos alimentados con un suplemento vitamínico, hubo un descenso que fue más acusado en los individuos alimentados con un suplemento de vitamina E. El PQ disminuyó significativamente los valores de GSH, no existiendo protección de los antioxidantes frente a este efecto. Los niveles de GSSG apenas se vieron afectados, excepto al sexto día ($P < 0,05$) donde hubo una disminución que no fue contrarrestada por ninguna de las dos vitaminas. El CuSO_4 , afectó a los niveles de GSH disminuyéndolos significativamente a tiempos cortos, este efecto fue eliminado por la vitamina C. Además, al final del experimento hubo un nivel máximo de glutatión reducido ($P < 0,001$), que fue contrarrestado por las dos vitaminas. En el caso del GSSG, los niveles disminuyeron durante toda la experiencia. La vitamina E protegió mejor a tiempos cortos y la vitamina C lo hizo a tiempos largos. Todos estos cambios en los niveles de glutatión tanto oxidado como reducido, se reflejan el estado redox de este metabolito.

De los dos compuestos estudiados, el CuSO_4 fue el que tuvo efectos oxidativos más claros. En la Figura 1 se resumen los efectos de este contaminante, con claros incrementos de las actividades G6PDH y GOR, y de los niveles de MDA. La vitamina C protegía parcialmente frente al estrés oxidativo generado por el Cu(II) , mientras que la vitamina E conseguía una protección total.

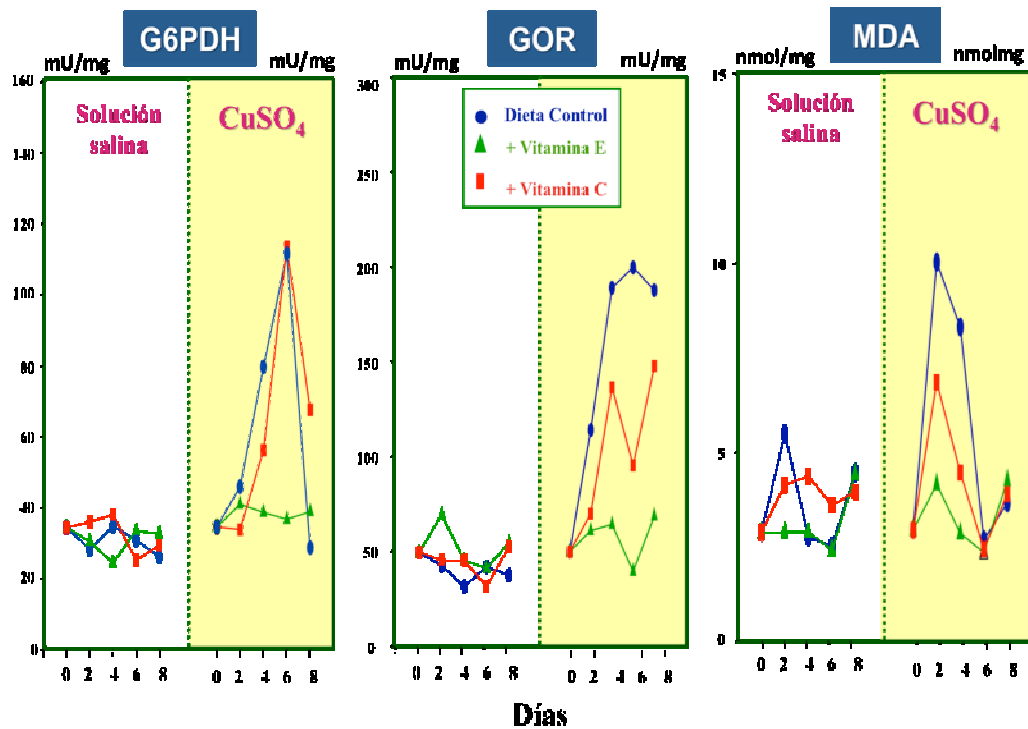


Figura 1: Niveles glucosa 6-P deshidrogenasa, glutatión reductasa y malondialdehído en lenguados inyectados con CuSO₄ en comparación con controles. Efecto protector de las vitaminas E y C.

Además de estos biomarcadores convencionales, se hizo un estudio proteómico paralelo. Para ello se analizaron los extractos citosólicos hepáticos de los lenguados tratados con solución salina y CuSO₄, dado que este contaminante causaba los efectos más claros en los biomarcadores. Además, se analizaron individuos alimentados con dieta control y con un suplemento de vitamina E, pues era esta la que más protegía frente a los efectos del CuSO₄. Se estudiaron, por triplicado, los hígados correspondientes a los individuos sacrificados a día 0 (controles) y pasados 4 y 6 días de la exposición, ya que en estos días se vieron los mayores efectos del tóxico sobre los daños (MDA) y las actividades enzimáticas, respectivamente. Se visualizaron un total de 2.926 proteínas en los geles estudiados (pH 4-7, PM 6,5-250 kDa), de las que 22 tenían un patrón específico de expresión proteica (PES) para el CuSO₄ (Tabla 2). De estos tres patrones, el A (inducción frente a CuSO₄ y represión con vitamina E) fue el más abundante. Como ejemplo, en la Figura 2 se representa el comportamiento seguido por 3 proteínas, cada una de ellas correspondiente a un PES distinto.

Tabla 2 PES encontrados en individuos expuestos a CuSO₄.

PES		Nº de proteínas
Inducción frente a CuSO ₄ y Represión con Vitamina E	A	12
Ausencia frente a CuSO ₄ e Inducción con Vitamina E	B	4
Presencia frente a CuSO ₄ y Ausencia o Inhibición con Vitamina E	C	6

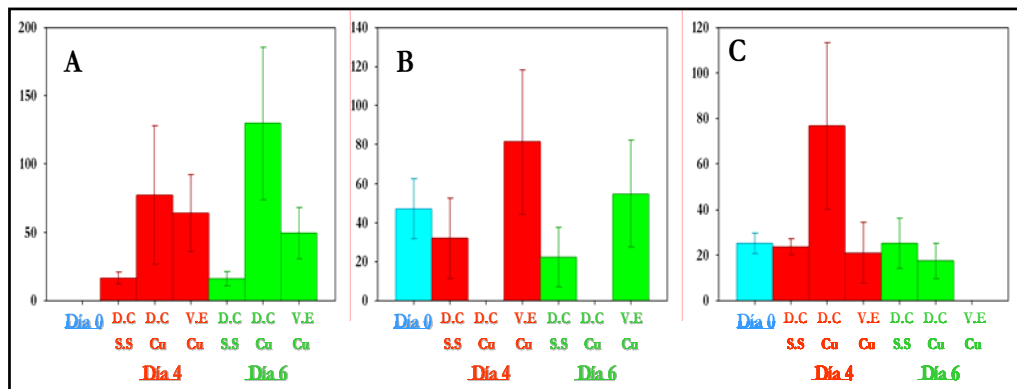


Figura 2: Ejemplos de proteínas que poseen un PES en relación a la presencia de CuSO₄. D.C: dieta control; V.E: vitamina E; S.S: solución salina; Cu: sulfato de cobre. Las letras A, B y C, corresponden a los tres PES encontrados.

En la Figura 3 se muestra un gel correspondiente al pool de individuos alimentados con dieta control y sacrificados tras 4 días de la exposición a CuSO₄, los números indican las distintas proteínas que muestran una expresión diferencial en los distintos tratamientos. Lo mismo se muestra en la Figura 4, pero en ella el gel corresponde a los individuos alimentados con un suplemento de vitamina E y sacrificados el mismo día que el pool anterior.

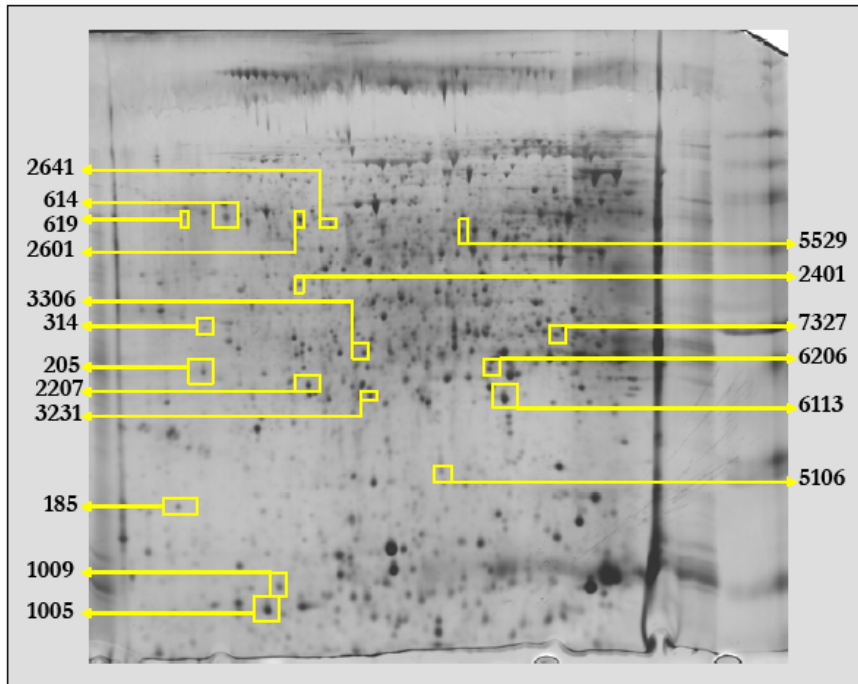


Figura 3: Gel correspondiente tratamiento con dieta control y pasados 4 días de la exposición a CuSO_4 .

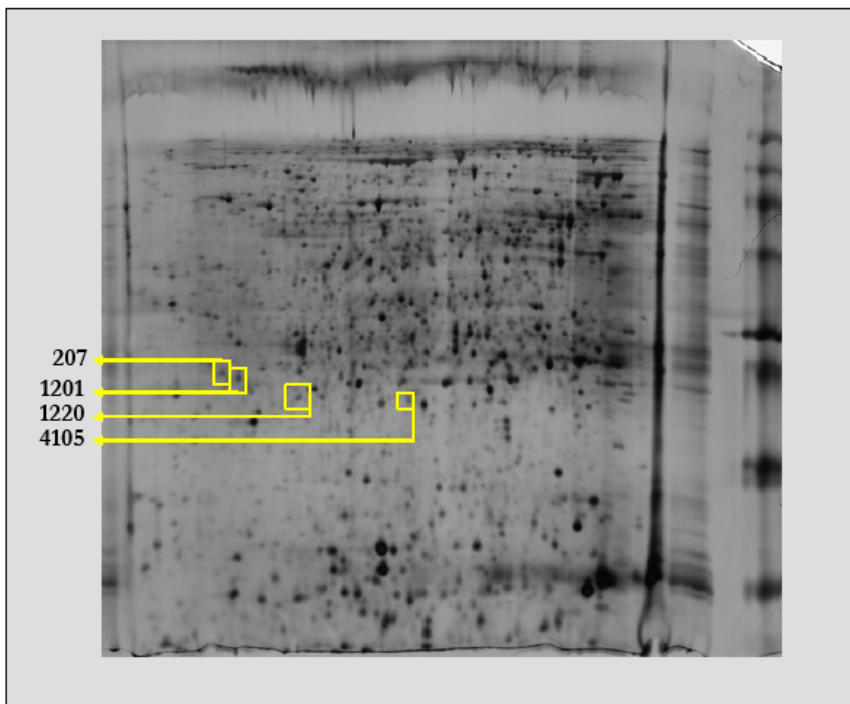


Figura 4: Gel correspondiente al tratamiento con vitamina E y pasados 4 días de la exposición a CuSO_4 .

Las 22 manchas seleccionadas por su expresión diferencial entre tratamientos fueron enviadas para su posible identificación mediante secuenciación “*de novo*” mediante espectrometría de masas (nESI-IT MS/MS). En la Tabla 3 se recogen las 7 manchas de proteínas que se han identificado y su función. Una mancha de proteína (SSP 1009) ha sido identificada como SH3BGRL, otra (SSP 5529) como FABP7 y, finalmente, 5 manchas de proteína (SPP 2207, 3231, 3306, 6113 y 7327) fueron identificadas como componentes C3 del sistema del complemento.

Tabla 3. Proteínas identificadas en hígado de lenguado por nESI-IT MS/MS

SSP	Proteína	Función
1009	SH3 domain binding glutamic acid-rich protein like (SH3BGRL)	Parece estar relacionada con las glutaredoxinas y la tioredoxina
5529	Brain-type fatty-acid binding protein 7 (FABP7)	Pertenece a la familia de proteínas que unen y transportan ácidos grasos (FABP). Está asociada con tumores en el cerebro y melanomas. Niveles elevados en el suero indican daño cerebral
2207, 3231, 3306, 6113, 7327	Complement component C3 (Component C3)	Juega un papel central en la activación del sistema del complemento. Se requiere para la de activación de las rutas clásica y alternativa del complemento. Los individuos con deficiencia en C3 son susceptibles de infección bacteriana.

La Figura 5 muestra la intensidad de las manchas de proteína identificadas con cada uno de los tratamientos. La proteína SH3BGRL se inducía tras el tratamiento con Cu(II), siendo la inducción mayor en presencia de vitamina E. La mancha identificada como FABP7 presentaba mayores intensidades con Cu(II), sobre todo a los 6 días, y el efecto era revertido en presencia de vitamina E. Por último, las 5 manchas de proteína que fueron identificadas como componentes del complemento C3 presentaron todas el mismo patrón, con una clara inducción tras

4 días de exposición a CuSO_4 ; la vitamina E protegía completamente del efecto inductor del Cu(II) .

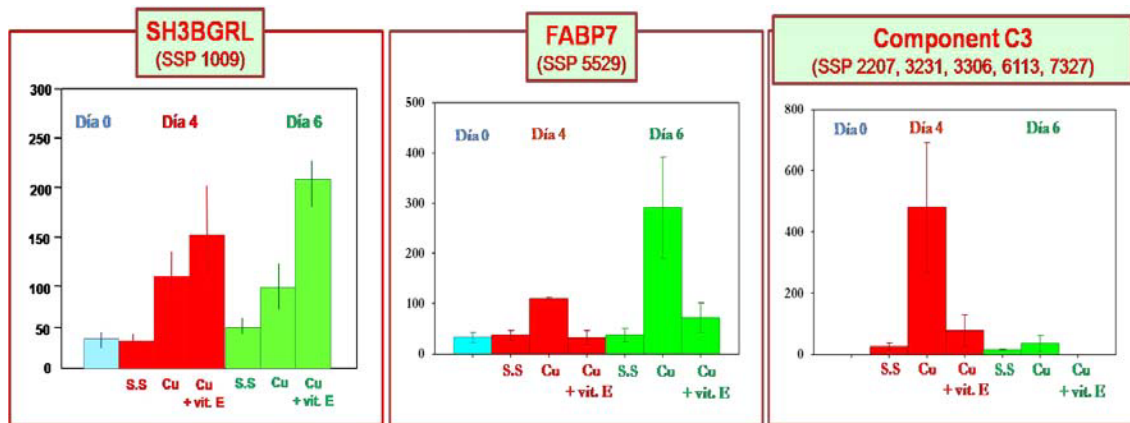


Figura 5: Intensidad de las manchas de proteína identificadas por nESI-IT MS/MS con cada uno de los tratamientos. S.S:solución salina; Cu: CuSO_4 ; V.E:vitamina E.

La ruta oxidativa de las pentosas fosfato constituye la mayor fuente de NADPH celular, el cual está envuelto, directa o indirectamente, en numerosos pasos de las reacciones de biotransformación de xenobióticos. La G6PDH y la 6PGDH constituyen las dos primeras enzimas de esta ruta oxidativa, ambas producen NADPH en sus respectivas reacciones. En este estudio hemos visto como la ruta oxidativa de las pentosas fosfato se ha activado tras la administración tanto de PQ como de CuSO_4 , lo cual queda reflejado en el aumento de la actividad de dichas enzimas, estos datos están de acuerdo con estudios hechos en individuos de *Oncorhynchus mykiss* sometidos a dosis de 30 nmol PQ/gr peso corporal (Akerman *et al*, 2003) y con estudios en individuos de *Sparus aurata* expuestos a PQ y a CuCl_2 (Rodríguez-Ariza *et al*, 1999). Las dos vitaminas empleadas en este estudio han contrarrestado la subida de actividad enzimática, excepto a tiempos largos en el caso de la G6PDH bajo la acción del CuSO_4 .

Este aumento de actividad, mostrado por estas dos enzimas auxiliares, está de acuerdo con el incremento que se observa en la actividad GOR tras 6 días de la exposición a PQ y durante toda la experiencia de exposición a CuSO_4 (Rodríguez-Ariza *et al*, 1999). Esta enzima es la encargada de mantener el estado redox intracelular del glutatión, reduciendo el GSSG resultante de reacciones de biotransformación de fase II, mediante una reacción dependiente de NADPH. El incremento observado en esta actividad biotransformadora está de acuerdo con estudios en individuos de *O. mykiss* sometidos a dosis de 3 y 10 mg/kg de PQ, (Stephensen *et al*, 2002), o a dosis de 30 nmol PQ/gr peso corporal (Akerman *et al*, 2003).

El aumento de actividad GOR también está en concordancia con el hecho de que la GST aumente en más de un 300 % su actividad tras 6 días de exposición a PQ y a CuSO_4 . Esta enzima cataliza la unión del GSH a diversos

xenobióticos o metabolitos de éstos, por tanto, la GST necesita una fuente continua de GSH bajo condiciones de estrés oxidativo. Esta fuente continua de GSH la constituye la GOR que, a su vez, cataliza la reducción del glutatión en una reacción dependiente de NADPH, y, como hemos dicho anteriormente, este poder reductor es suministrado por la G6PDH y la 6PGDH que también aumentan su actividad bajo los efectos del PQ y del CuSO_4 . Por tanto, podemos decir, que nuestros lenguados han experimentado una condición de estrés oxidativo provocada por la inyección de los dos tóxicos empleados en este estudio. Nuestro estudio concuerda con otros realizados en *S. aurata* donde se ha visto que la actividad GST incrementa significativamente tras dos días de una exposición a 0,2 mg/kg de CuCl_2 (Martinez-Lara *et al*, 1996), también ocurre en individuos de *O. mykiss* cuando son expuestos a dosis de 3 y 10 mg/kg de PQ, donde la actividad GST aumenta el doble tras 5 días de la exposición (Stephensen *et al*, 2002), lo mismo que en individuos de *Oreochromis mossambicus* expuestos a concentraciones subletales de cadmio (Siraj Basha and Usha Rani, 2003).

La función de la KAT es la de eliminar el H_2O_2 . En nuestro estudio esta actividad sufre un incremento significativo pasados dos días de la exposición a PQ, del que protege la vitamina C, lo cual es otro dato más que nos confirma que hemos sido capaces de generar estrés oxidativo en los lenguados tratados. El descenso en los niveles de actividad KAT a tiempos largos puede ser debido a la inhibición de la enzima por $\text{O}_2^{\cdot-}$ (Sayeed *et al*, 2003), lo que concuerda con el hecho de que la actividad SOD no se vio incrementada (datos no mostrados), con lo que el nivel de $\text{O}_2^{\cdot-}$ en la célula debe ser mayor a tiempos largos. Ninguno de los dos antioxidantes empleados fue capaz de eliminar esta posible inhibición de la KAT. En el caso de la exposición a CuSO_4 , la actividad KAT se redujo desde el primer momento. Existen estudios que indican que una elevada concentración de Cu (II) hepático inhibe a esta enzima (Liu *et al*, 2005), se ha sugerido que puede ser o bien directamente mediante una alteración de la estructura tridimensional de la enzima o bien una disminución en su síntesis. Este descenso en la actividad KAT fue eliminado por las dos vitaminas, aunque fue la vitamina E la más efectiva.

Los niveles de GSH disminuyen significativamente en los individuos control expuestos a solución salina, este efecto se ve contrarrestado eficazmente por la vitamina E. Esto indica que los individuos son sensibles al estrés por manipulación. En el caso de la forma oxidada, los individuos alimentados con dieta control no experimentan cambio alguno; en cambio, hay un descenso significativo de los niveles de GSSG en aquellos individuos alimentados con un suplemento vitamínico, descenso que es más acusado para la vitamina E. En principio, la disminución de GSH debería estar correlacionada con un aumento de los niveles de GSSG, sin embargo esto no es lo que ocurre. La explicación a este fenómeno puede deberse a que una parte del GSSG esté unido a proteínas formando disulfuros mixtos (Rodríguez-Ariza *et al*, 1994), lo cual constituye un reservorio de GSH, ya que cada molécula de glutatión oxidado acoplada a un grupo $-\text{SH}$ de las proteínas, al ser liberada, regenera una molécula de GSH. Otra explicación podría ser que el GSSG sea conocido como un conjugado de GSH por el transportador encargado de sacar de la célula a los conjugados con

glutación resultantes de reacciones de biotransformación de fase II, de esta forma el GSSG sería eliminado del ambiente intracelular.

Los efectos de la exposición a PQ se reflejan en la disminución que sufre el nivel de GSH, lo que concuerda con estudios que ponen de manifiesto que los niveles de GSH son muy vulnerables al PQ ya que dicho metabolito juega un papel importante en la defensa frente a este tóxico (Suntres, 2002; Parvez and Raisuddin, 2006). Además, la disminución de GSH se relaciona con el aumento que sufre tanto la GOR, para poder restablecer los niveles normales de GSH, como la GST, que lo emplea como poder reductor, tras la exposición a PQ. En cuanto a los niveles de GSSG, no se ven afectados por el PQ, excepto a día 6 donde hay una disminución significativa con respecto a los controles del día 0, que no es eliminada por la acción de ninguna de las dos vitaminas. El CuSO_4 provoca mayores cambios en el estado redox del glutatión. Disminuye significativamente el nivel de GSH a tiempos cortos y lo mismo ocurre con el GSSG pero el descenso dura durante todo el experimento. La vitamina C contrarresta mejor los efectos de CuSO_4 sobre el estado redox del glutatión. La disminución de los niveles de GSH esta en concordancia con otros estudios en individuos de *Cyprinus carpio* donde se indica que el nivel de GSH se ve drásticamente disminuido frente a una dosis de 10 mg/kg de CuSO_4 (Varanka *et al*, 2001)

El MDA es un metabolito procedente de la peroxidación lipídica que es ampliamente usado como biomarcador de daño hepático debido al estrés oxidativo. En nuestro estudio hemos visto como los niveles de MDA aumentan, primero tras la inyección de solución salina. Esto, junto con el cambio en los niveles de actividad GST (aumento) y KAT (disminución) provocados por este mismo tratamiento, así como el incremento observado en el estado redox del glutatión, ponen de manifiesto que los individuos juveniles de *S. senegalensis* resultan metabólicamente alterados tras una simple manipulación humana. En los primeros días tras la exposición tanto a PQ como a CuSO_4 , los niveles de MDA se dispararon, lo que nos confirma que ambos tóxicos provocan estrés oxidativo en los lenguados juveniles. Estos datos están en concordancia con otros estudios donde se ha visto que los niveles de este biomarcador se incrementan en hígados de peces sometidos a condiciones de estrés oxidativo (Pedrajas *et al*, 1995; Rau *et al*, 2004; Morales *et al*, 2004; Gül *et al*, 2004). Las dos vitaminas estudiadas protegieron frente a la peroxidación lipídica, aunque en el caso del CuSO_4 , la vitamina E fue más efectiva. Ésta protección mayor de la vitamina E es lógica puesto que dicha vitamina es liposoluble y es la encargada en el organismo de la protección de las membranas frente a la oxidación de sus PUFAs, además, se ha comprobado que la peroxidación lipídica disminuye en hígados de individuos alimentados con un suplemento de esta vitamina (Huang *et al*, 2003).

Existen pocos estudios que empleen aproximaciones proteómicas para identificar situaciones de estrés oxidativo en peces (Hogstrand *et al*, 2002, Martin *et al*, 2003). Sin embargo, la proteómica es una potente arma en este campo, ya que nos puede abrir nuevas vías de investigación encaminadas a la caracterización de nuevos biomarcadores de estrés oxidativo. Además, si se

identifican los PES característicos de la exposición a distintos tóxicos, seríamos capaces de saber, en poco tiempo, si un pez está sometido a estrés oxidativo o no. En nuestro estudio se han caracterizado 3 PES correspondientes a la exposición a CuSO_4 . En el primero de ellos (A) se produce una inducción de la expresión proteica bajo la acción del tóxico, esta inducción es eliminada por la acción de la vitamina E, un total de 12 proteínas muestran este comportamiento. En el segundo PES (B) el CuSO_4 inhibe completamente la expresión proteica, efecto que se ve contrarrestado por la vitamina E, en este caso fueron 4 las proteínas que mostraron este comportamiento. Por último, existe un PES (C) donde el tóxico provoca que la proteína se exprese y donde la vitamina E inhibe total o parcialmente la expresión proteica, este comportamiento fue seguido por 6 proteínas. Hay que decir, que no se ha hecho una distinción, dentro de cada PES, en cuanto a que los cambios de expresión se produzcan a día 4, a día 6 o se originen durante todo el experimento. También es destacable que el estrés, comentado antes, que se produce en los individuos por una simple manipulación humana (inyección de solución salina) también se ve reflejado en la expresión de algunas proteínas. Esto es lo que ocurre en la primera proteína que se muestra en la Figura 10, se ve como en los individuos sacrificados a día 0 (no inyectados) no existe expresión proteica, en cambio, el simple pinchazo de solución salina provoca un importante incremento de la expresión que es contrarrestado por la vitamina E, aunque no desaparezca totalmente la expresión, este efecto se mantiene durante todo el experimento.

Se vieron cambios en el proteoma de lenguados sometidos a estrés oxidativo, en 22 proteínas, de las cuales se identificaron 7 por secuenciación “*de novo*” por nESI-IT MS/MS. Una de ellas era la SH3BGRL, relacionada con glutaredoxina y tioredoxina. Otra, que se inducía tras 6 días de exposición a CuSO_4 era la FABP7, una proteína cuyos niveles aumentados en suero indican daño cerebral. Otras 5 proteínas fueron identificadas como componentes C3 del sistema del complemento y pueden ser fragmentos resultantes de su activación en respuesta al estrés oxidativo generado por el Cu(II) . Tanto la inducción de FABP7, como de los componentes del complemento C3 identificados, es completamente revertida cuando la dieta se suplementa con vitamina E.

En cuanto a las dos vitaminas estudiadas podemos decir a modo de resumen, que la vitamina E resultó ser más efectiva en la protección frente al estrés oxidativo. La razón de esta mayor protección puede estar en que la vitamina C es polar y al ser suministrada con el pienso, ha podido sufrir una cierta liberación al medio acuoso, con lo que la dosis tomada por los individuos ha podido ser menor a la suministrada. Los pocos estudios que existen sobre la administración de vitaminas en la alimentación de peces, ponen de manifiesto, sobre todo en el caso de la vitamina C, que su función protectora depende de muchos factores como son la especie estudiada, el tipo de estrés provocado, las condiciones ambientales, etc (Ortuño *et al*, 2003). Nuestros datos en cuanto a que la vitamina E es más efectiva que la C, están de acuerdo con estudios realizados con individuos de *S. aurata* a los que se les ha sometido a una condición de estrés oxidativo mediante el hacinamiento en tanques de cultivo, se sabe que esta

situación provoca este tipo de estrés porque, entre otros datos, provoca un incremento en los niveles en plasma de cortisol, lo que constituye un biomarcador de estrés oxidativo (Montero *et al*, 1999a).

La protección ejercida por las dos vitaminas no ha sido constante ni a lo largo del tiempo ni en todos los biomarcadores ensayados. Esta variabilidad puede deberse a que las dosis empleadas no han sido lo suficientemente elevadas. Estudios realizados en *S. aurata* indican que las dosis efectivas son para la vitamina C de 3 gr/kg de dieta y para la vitamina E de 1,2 gr/kg de dieta, además se ha visto que la máxima concentración en suero de las dos vitaminas se consigue tras 4 semanas (Ortuño *et al*, 2003). En nuestro caso, la alimentación con el suplemento antioxidativo sólo duró 10 días, por lo que es posible que no se haya dado tiempo suficiente para que los niveles de vitaminas sean los adecuados para que ejerzan una buena acción protectora.

2. Cambios de temperatura como factor de estrés en el cultivo del lenguado. Efecto de la dieta.

La Figura 6 muestra como en lenguados alimentados con presa viva se observa un incremento en la proteína hepática cuando la temperatura se incrementa 5°C (hasta 25°C) de forma aguda, mientras que la GOR se induce cuando la exposición a esta temperatura es crónica. Los resultados más claros se observan, sin embargo, en lenguados alimentados con pienso. Se producen claros síntomas de estrés oxidativo cuando los animales se exponen a incrementos de 5°C de la temperatura del agua (agudo y crónico), con aumentos de las tres actividades enzimáticas (G6PDH, 6PGDH, GOR) y de la proteína hepática. No se observó ningún cambio con ninguna de las dos dietas cuando la temperatura del agua se bajó 5°C hasta los 15°C.

Resultados similares a los descritos se observó cuando se analizaron y separaron las distintas isoenzimas de la superóxido dismutasa en geles de isoelectroenfoque, seguido de tinción de actividad su *in situ* (Figura 7). Se observa una inhibición de la actividad de varias de las isoenzimas SOD de pl intermedio en lenguados alimentados con presa viva y expuestos a incrementos agudos de 5°C en la temperatura. Este efecto es más claro en lenguados alimentados con pienso, y se observa tanto con exposiciones agudas como crónicas. De nuevo, el descenso de la temperatura hasta alcanzar los 15°C no tiene efecto alguno en el patrón de isoformas SOD.

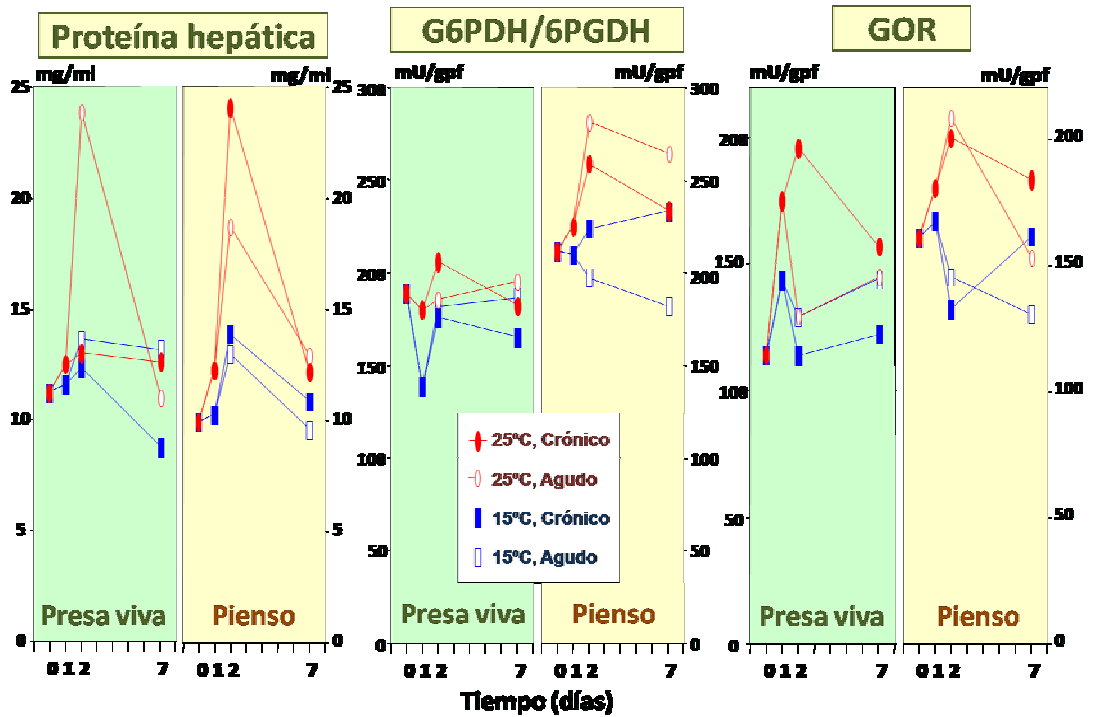


Figura 6: Niveles proteína hepática, glucosa 6-P y 6-P-gluconato deshidrogenasas, y glutatión reductasa en lenguados sometidos a cambios crónicos y agudos de temperatura. Efecto de la dieta.

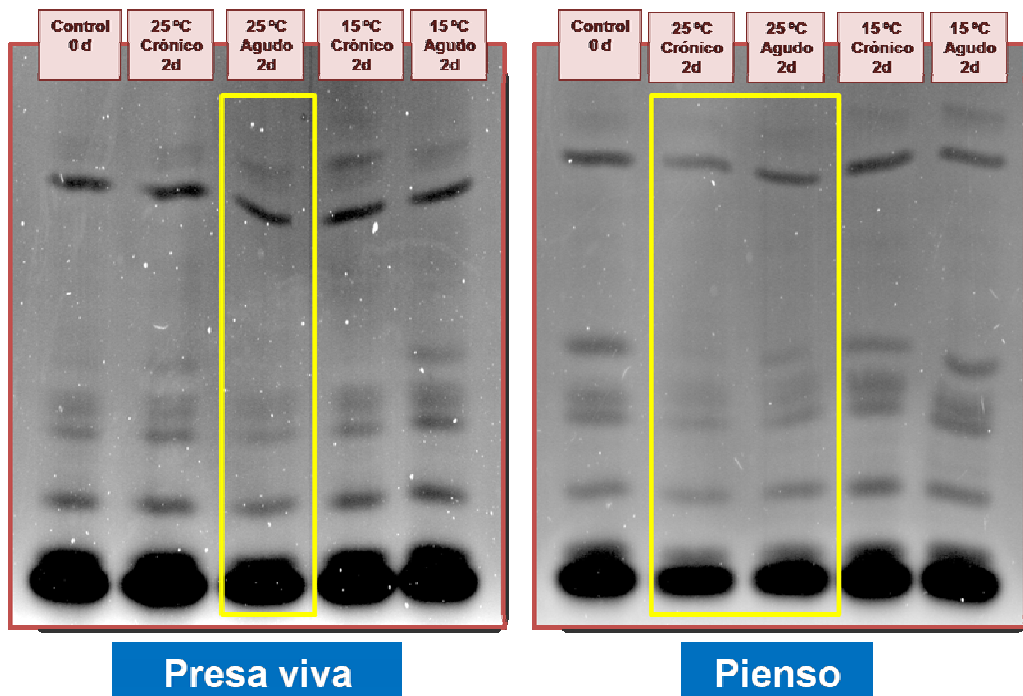


Figura 7: Separación de isoenzimas de SOD en geles IEF (pH 4-6,5) y tinción de actividad *in situ*.

3. Estudio de la densidad de carga como factor de estrés en el cultivo del lenguado.

Se estudió el efecto de la densidad de cultivo en lenguados mantenidos 22 días a 1,15, 5,75, 11,5 y 30 kg m⁻². A varios tiempos se midieron 4 enzimas del metabolismo central (G6PDH, 6PGDH, ICDH, GAPDH), 4 antioxidativas primarias (KAT, SOD, GPx) y 2 auxiliares (GOR, GST). También se midió el estado redox del glutatión, el daño oxidativo en membranas (MDA) y el nivel de 10 nucleótidos y nucleósidos, centrándonos sobre todo en AMP, ADP, ATP para calcular la carga energética adenilica (AEC), un parámetro clave del bienestar fisiológico.

Cinco de los veinte biomarcadores estudiados, G6PDH, 6PGDH, SOD, GOR y Se-GPx, apenas variaron con la densidad. En cambio, la actividad GAPDH (Figura 8), relacionada con glicólisis y gluconeogénesis, aumentó con el tiempo a las dos densidades menores, aunque a 11,5 Kg m⁻², su aumento no fue significativo (P < 0,05). La ICDH, relacionada con el ciclo de Krebs, también aumentó con el tiempo a las tres densidades, aunque sólo a 11,5 Kg m⁻² volvió a niveles normales a 22 días. El aumento de ambas actividades indica que, sobre todo a densidades bajas, los peces movilizan sus reservas hepáticas, de acuerdo con la gran demanda energética provocada por cambios en la densidad de cultivo (Montero *et al*, 1999b; Papoutsoglou *et al*, 2006; Ruane *et al*, 2002; Sangiao-Alvarellos *et al*, 2005; Srivastava and Sahai, 1987).

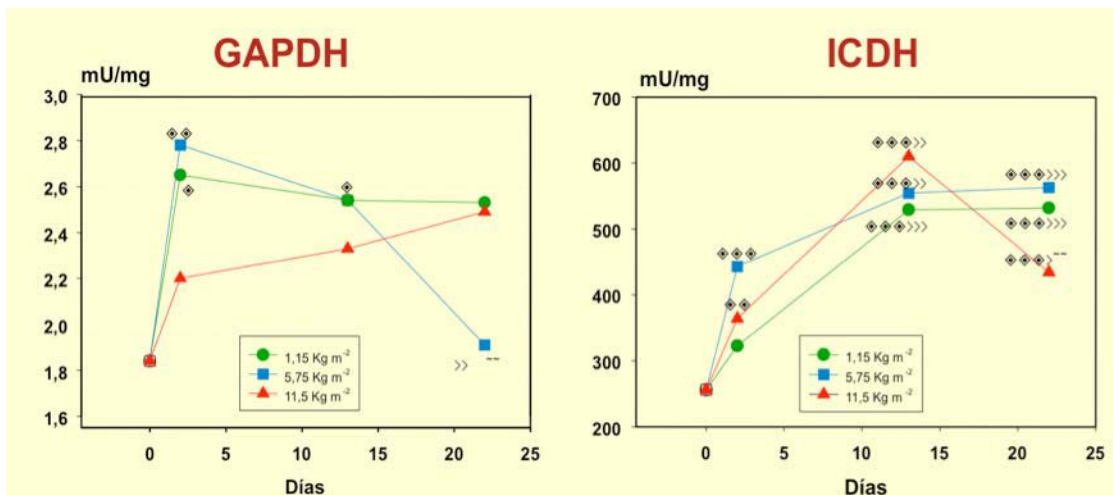


Figura 8: Niveles hepáticos de GAPDH e ICDH en respuesta a la densidad. Los símbolos indican las diferencias significativas respecto a los días 0 (◇), 2 (●) y 13 (●): * P<0,05; ** P<0,01 y *** P<0,001.

De las enzimas antioxidativas primarias analizadas, sólo catalasa (KAT) y glutatión peroxidasa total (GPx-total) respondieron a la densidad (Figura 9). La KAT, que elimina H₂O₂, aumentó a día 13 a las tres densidades, volviendo a valores normales al final. La GPx-total, que elimina peróxidos derivados del ataque por EROs a los lípidos poliinsaturados, aumentó durante todo el experimento, aunque con aumentos mayores a 11,5 Kg m⁻². El aumento de

ambas actividades concuerda con lo descrito en peces bajo estrés agudo, donde salen masivamente macrófagos del riñón cefálico a la sangre, provocando un aumento de los procesos fagocíticos (Ruane *et al*, 2002). Como la fagocitosis aumenta la producción de EROs, la subida de ambas enzimas podría proteger los peces cultivados a altas densidades de la activación del sistema inmune.

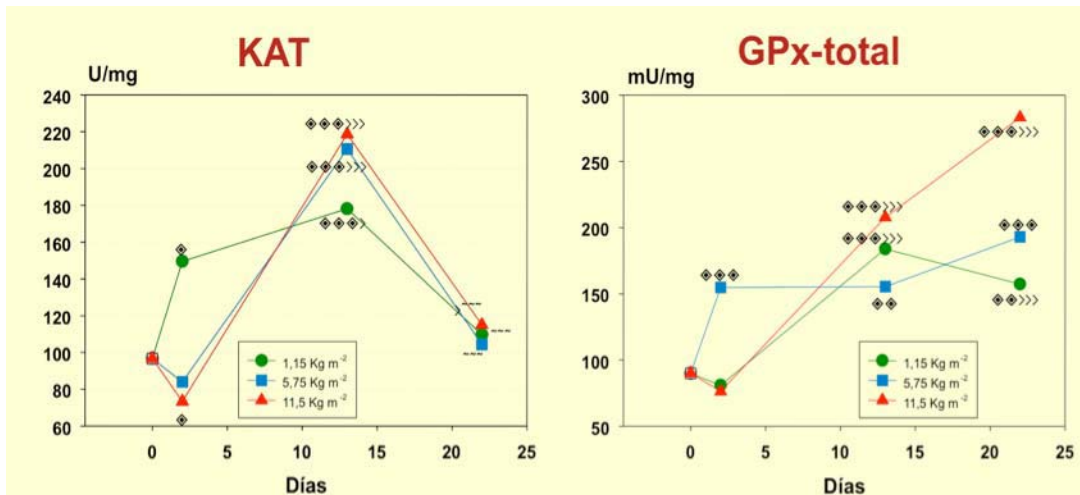


Figura 9: Niveles hepáticos de KAT Y GPX-total en respuesta a la densidad. Los símbolos indican las diferencias significativas respecto a los días 0 (◇), 2 (●) y 13 (●): * P<0,05; ** P<0,01 y *** P<0,001.

La glutatión transferasa (GST) conjuga glutatión reducido (GSH) con sustratos electrofílicos y posee actividad antioxidativa al reducir hidroperóxidos. Como muestra la Figura 10, la GST varió como las dos enzimas antioxidativas descritas, con un máximo a día 13, sobre todo a 11,5 Kg m⁻², volviendo a valores normales al final. El glutatión es un tripéptido cuyo grupo-SH mantiene el estado redox, se une a electrófilos endógenos/exógenos, y reduce peróxidos en reacciones catalizadas por GPx y GST. Se analizaron los niveles de glutatión reducido (GSH) y oxidado (GSSG), reflejados en su estado redox (2xGSSG/GSH). Un animal está mejor cuanto menos oxidado esté el glutatión y tenga menos estrés oxidativo. La Figura 10 muestra que a mayor densidad el glutatión estaba menos oxidado, es decir, menos GSSG y más GSH. El menor estrés oxidativo a densidades mayores sugiere que el aumento de la densidad disminuía el estrés.

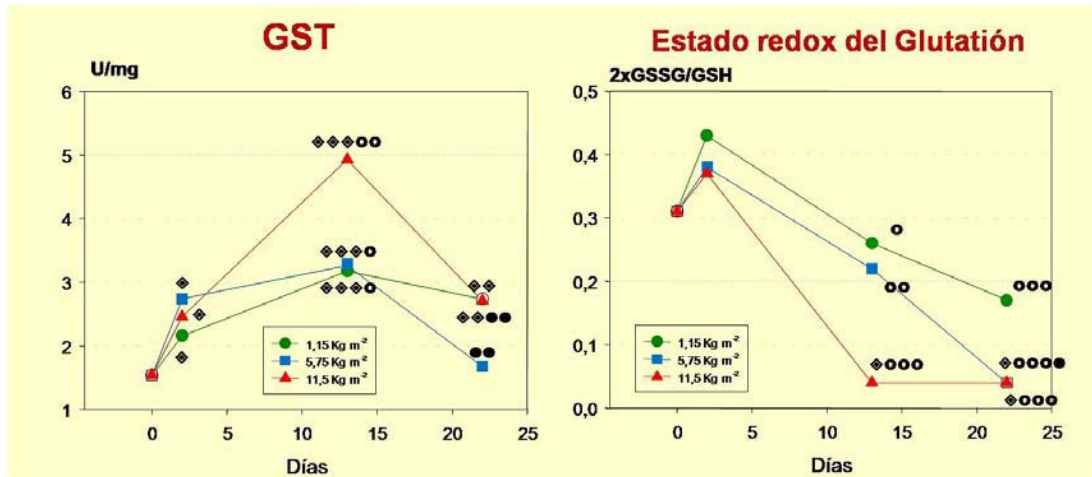


Figura 10: Niveles hepáticos de GST y estado redox del glutati3n. Los s3mbolos indican las diferencias significativas respecto a los d3as 0 (◊), 2 (●) y 13 (●): * P<0,05; ** P<0,01 y *** P<0,001.

Como el exceso de EROs, o estr3s oxidativo, daa las biomol3culas, se midi3 el malondialdeh3do (MDA), producto de la peroxidaci3n de los l3pidos poliinsaturados. Como muestra la Figura 11, el MDA aument3 a 2 d3as a 1,15 y 11,5 Kg m⁻², probablemente debido al manejo, y descend3 luego hasta niveles inferiores al inicial. En cambio, a 5,75 Kg m⁻², fue menor que en peces control todo el experimento. Nuestros resultados indican que los lenguados tienen mayor bienestar a 11,5 Kg m⁻², con menos daa oxidativos y glutati3n menos oxidado, debido a la inducci3n de varias enzimas antioxidativas, primarias y auxiliares. En cambio, los animales estaban peor a 1,15 Kg m⁻².

Como enzimas metab3licas clave aumentaban con la densidad, se midieron diversos nucle3tidos y nucle3sidos. La Figura 11 muestra la carga energ3tica aden3lica (AEC) $ATP + \frac{1}{2}ADP / ATP + ADP + AMP$. Ya al inicio del experimento (d3a 0) los peces ten3an gran demanda energ3tica, con AEC muy baja (0,32). Al pasar a distintas densidades empeor3 su AEC, aunque estaban mejor a 11,5 Kg m⁻², con AEC cercana a la inicial, subiendo incluso al final. Los peces mostraron a 5,75 menos AEC (~0,26) que a 11,5 Kg m⁻². La menor carga energ3tica se obtuvo a 1,15 Kg m⁻².

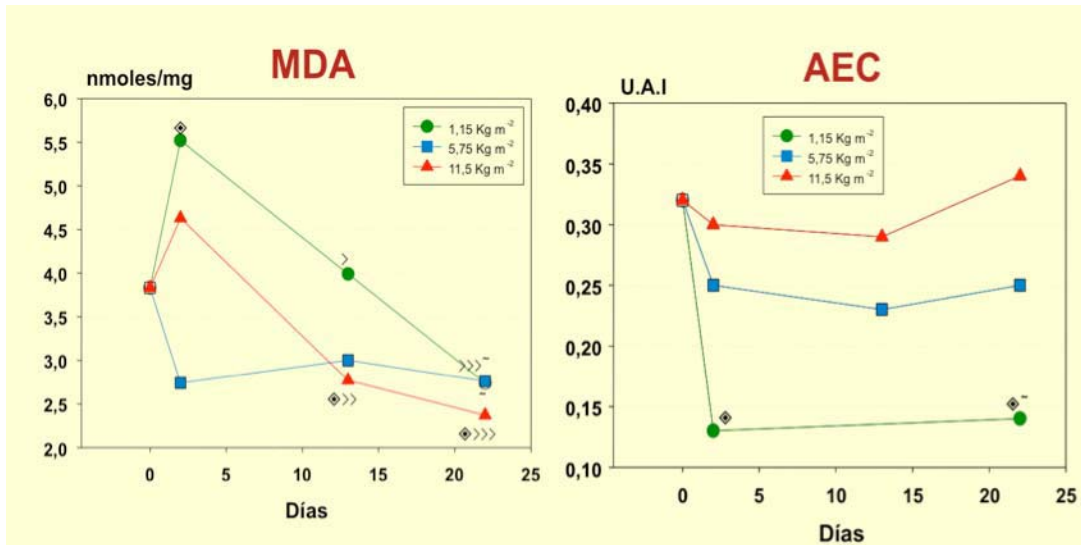


Figura 11: Niveles de malondialdehído y carga energética en hígados de lenguados. Los símbolos indican las diferencias significativas respecto a los días 0 (◇), 2 (●) y 13 (●): * P<0,05; ** P<0,01 y *** P<0,001.

Se diseñó otro experimento para averiguar la AEC a alta densidad. Los lenguados mantenidos a $\sim 30 \text{ Kg m}^{-2}$ tienen menor AEC ($\sim 0,27$) que a $11,5 \text{ Kg m}^{-2}$, por lo que no es aconsejable alcanzar densidades tan altas. Esto lo confirma el nivel de MDA en este experimento, mucho mayor en lenguados mantenidos a $\sim 30 \text{ Kg m}^{-2}$ (Figura 12).

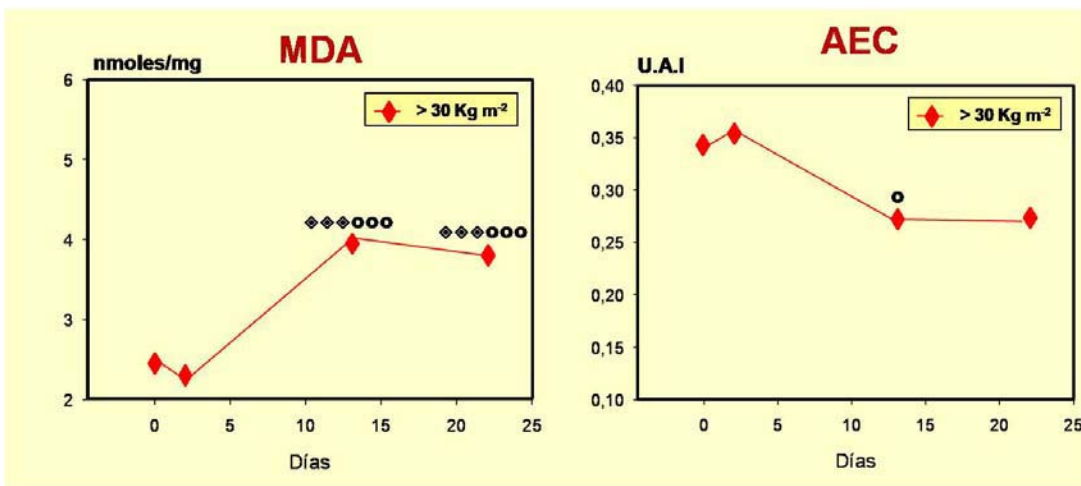


Figura 12: Niveles de malondialdehído y carga energética adenilica en hígados de lenguados mantenidos a una densidad de $\sim 30 \text{ Kg m}^{-2}$. Los símbolos indican las diferencias significativas respecto a los días 0 (◇), 2 (●) y 13 (●): * P<0,05; ** P<0,01 y *** P<0,001.

2.5.B4. CONCLUSIONES

Al estudiar el efecto de contaminantes como el paraquat y el CuSO_4 , este último tuvo efectos oxidativos más claros sobre el lenguado, con incrementos de las actividades G6PDH y GOR entre otras, y de los niveles de MDA y del estado redox del glutatión.

La vitamina C protegió parcialmente frente al estrés oxidativo generado por el Cu(II) , mientras que la vitamina E consiguió una protección total.

Se ha realizado una aproximación proteómica para identificar situaciones de estrés oxidativo. Los lenguados expuestos a Cu(II) mostraron cambios en el proteoma, concretamente en 22 proteínas, de las que se identificaron 7 por secuenciación “*de novo*” por nESI-IT MS/MS. Una de ellas era la SH3BGRL, relacionada con glutaredoxina y tioredoxina. Otra, que se inducía tras 6 días de exposición era la FABP7, una proteína cuyos niveles aumentados en suero indican daño cerebral. Otras 5 proteínas fueron identificadas como componentes C3 del sistema del complemento y pueden ser fragmentos resultantes de su activación en respuesta al estrés oxidativo generado por el Cu(II) . Tanto la inducción de FABP7, como de los componentes del complemento C3 identificados, era completamente revertida cuando la dieta se suplementó con vitamina E.

Al estudiar el efecto de la temperatura se compararon dos tipos de dietas: una basada en presa viva y otra con pienso. Los resultados más claros se observaron en lenguados alimentados con pienso. Se observaban claros síntomas de estrés oxidativo cuando los animales se exponían a incrementos de 5°C de la temperatura del agua (agudo y crónico) hasta los 25°C , con aumentos de tres actividades enzimáticas (G6PDH, 6PGDH, GOR) y de la proteína hepática, e inhibición de varias de las isoenzimas SOD. No se observó ningún cambio con ninguna de las dos dietas cuando la temperatura del agua se bajó 5°C hasta los 15°C .

Al estudiar la densidad de cultivo, comprobamos que los lenguados tenían mayor bienestar a $11,5 \text{ Kg m}^{-2}$, con mayor carga energética, menos daños oxidativos y glutatión menos oxidado, debido a la inducción de varias enzimas antioxidativas, primarias y auxiliares. En cambio, los animales estaban en peores condiciones, desde este punto de vista, a la menor ($1,15 \text{ Kg m}^{-2}$) y mayor ($\sim 30 \text{ Kg m}^{-2}$) densidades de cultivo estudiadas.

2.6.B4. VALORACIÓN

En este estudio se ha comprobado que el PQ y el CuSO_4 a dosis elevadas, producen estrés oxidativo en individuos juveniles de *S. senegalensis*. Se ha caracterizado una serie de biomarcadores que pueden ser empleados en futuras experiencias para evaluar el grado de estrés oxidativo de los lenguados. Además,

se han identificado 22 proteínas que se ven alteradas en los lenguados, bajo condiciones de estrés oxidativo, de las cuales se han identificado 7 manchas de proteínas mediante secuenciación *de novo* por nESI-IT MS/MS y posterior búsqueda por homología en las bases de datos. Se ha visto que las vitaminas E y C ejercen una función protectora en los individuos ensayados. Sin embargo, son necesarios nuevos estudios para establecer qué dosis de estas dos vitaminas son las más efectivas en individuos de *S. senegalensis*.

La confirmación del importante papel de la dieta natural en la capacidad de defensa del lenguado frente a estrés por temperatura está en sintonía con otros resultados similares obtenidos para otros objetivos de este proyecto.

La mayor carga energética adenilica registrada en densidades elevadas de cultivo revela que el lenguado presenta una mayor demanda de energía cuando se incrementa este factor. Esta situación, que es coherente con las mayores tasas metabólicas encontradas anteriormente, requiere no obstante más estudios que aclaren el porqué también se incrementa en densidades bajas de estabulación.

2.7.B4. DIFUSIÓN

Presentaciones poster Congresos:

Cánovas-Conesa, B., E. Salas-Leiton, J. Alhama, J. López-Barea y J.P. Cañavate. Efecto de la Densidad de Cultivo sobre los Biomarcadores Bioquímicos y la Carga Energética en el Lenguado Senegalés (*Solea senegalensis*). Comunicación XI Congreso Nacional de Acuicultura. Vigo, Septiembre 2007.

Cánovas-Conesa, B., Alhama, J., Salas, E., Cañavate, J.P., López-Barea, J. Respuestas del lenguado *Solea senegalensis* al estrés oxidativo causado por cobre y paraquat, y efecto protector de antioxidantes. 6th Iberian and 3rd Iberoamerican Congress of Environmental Contamination and Toxicology Cádiz. Septiembre 2005.

Canovas, B., Alhama, J., Salas, E., Cañavate, J.P., López-Barea, J. Estrés oxidativo provocado por cobre y paraquat en el lenguado *Solea senegalensis*. Efecto protector de antioxidantes. XVI Congreso Español de Toxicología. Cáceres. Septiembre 2005.

2.8.B4. INCIDENCIAS DE DESARROLLO

2.9.B4. BIBLIOGRAFÍA

Akerman G, Amcoff P, Tjarnlund U, Fogelberg K, Torrissen O, Balk L. 2003. *Paraquat and menadione exposure of rainbow trout (Oncorhynchus mykiss)--studies of effects on the pentose-phosphate shunt and thiamine levels in liver and kidney*. Chem Biol Interact 142:269-283.

Hamre K, Waagbo R, Berge RK, Lie O. 1997. *Vitamins C and E interact in juvenile Atlantic Salmo (Salmo salar, L.)*. Free Radic Biol Med 22:137-149.

- Hogstrand C, Balesaria S, Glover CN. 2002. *Application of genomics and proteomics for study of the integrated response to zinc exposure in a non-model fish species, the rainbow trout*. Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol 133:523-535.
- Huang C, Chang R, Huang S, Chen W. 2003. *Dietary vitamin E supplementation affects tissue lipid peroxidation of hybrid tilapia, Oreochromis niloticus x O. aureus*. Comp Biochem and Physiology, Part B 134:265-270.
- Liu H, Wang W, Zhang J, Wang X. 2005. *Effects of copper and its ethylenediaminetetraacetate complex on the antioxidant defenses of the goldfish, Carassius auratus*. Ecotoxicol Environ Saf
- Martin SA, Vilhelmsson O, Medale F, Watt P, Kaushik S, Houlihan DF. 2003. *Proteomic sensitivity to dietary manipulations in rainbow trout*. Biochim Biophys Acta 1651:17-29.
- Martinez-Lara E, Toribio F, Lopez-Barea J, Barcena JA. 1996. *Glutathione-S-transferase isoenzyme patterns in the gilthead seabream (Sparus aurata) exposed to environmental contaminants*. Comparative Biochemistry and Physiology C-Pharmacology Toxicology & Endocrinology 113:215-220.
- Montero D, Marrero M, Izquierdo MS, Robaina L, Vergara JM, Tort L. 1999a. *Effect of vitamin E and C dietary supplementation on some immune parameters of gilthead seabream (Sparus aurata) juveniles subjected to crowding stress*. Aquaculture 171:269-278.
- Montero, D., Izquierdo, M.S., Tort, L., Robaina, L., Vergara, J.M. 1999b. *High stocking density produces crowding stress altering some physiological and biochemical parameters in gilthead seabream, Sparus aurata, juveniles*. Fish Physiol Biochem 20, 53-60.
- Morales AE, Pérez-Jiménez A, Hidalgo MC, Abellán E, Cardenete G. 2004. *Oxidative stress and antioxidant defenses after prolonged starvation in Dentex dentex liver*. Comp Biochem and Physiology, Part C139:153-161.
- Mortz E, Krogh TN, Vorum H, Gorg A. 2001. *Improved silver staining protocols for high sensitivity protein identification using matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight analysis*. Proteomics 1:1359-1363.
- Ortuño J, Esteban MA, Meseguer J. 2003. *The effect of dietary intake of vitamins C and E on the stress response of gilthead seabream (Sparus aurata L.)*. Fish and Shellfish Immunology 14:145-156.
- Papoutsoglou, S.E., Karakatsouli, N., Pizzonia, G., Dalla, C., Polissidis, A., Papadopoulou-Daifoti, Z. 2006. *Effects of rearing density on growth, brain neurotransmitters and liver fatty acid composition of juvenile white sea bream Diplodus sargus L.* Aquac Res 37, 87-95.
- Parvez S, Raisuddin S. 2006. *Effects of paraquat on the freshwater fish Channa punctata (Bloch): non-enzymatic antioxidants as biomarkers of exposure*. Arch Environ Contam Toxicol 50:392-397.
- Pedrajas JR, Peinado J, López-Barea J. 1995. *Oxidative stress in fish exposed to model xenobiotics. Oxidatively modified forms of Cu,Zn-superoxide dismutase as potential biomarkers*. Chem Biol Interact 98:267-282.
- Pedrajas JR, Peinado J, López-Barea J. 1993. *Purification of Cu,Zn-superoxide dismutase isoenzymes from fish liver: appearance of new isoforms as a consequence of pollution*. Free Rad. Res. Comms. 19:29-41.
- Peinado J, Florindo J, López-Barea J. 1992. *Glutathione reductase from Saccharomyces cerevisiae undergoes redox interconversion in situ and in vivo*. Mol. Cell. Biochem. 110.
- Perkins EJ, Griffin B, Hobbs M, Gollon J, Wolford L, Schlenk D. 1997. *Sexual differences mortality and sublethal stress in channel catfish following a 10 week exposure to copper sulfate*. Aquat Toxicol 37:327-339.
- Rau MA, Whitaker J, Freedman JH, Di Giulio RT. 2004. *Differential susceptibility of fish and rat liver cells to oxidative stress and cytotoxicity upon exposure to prooxidants*. Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol 137:335-342.
- Rodriguez-Ariza A, Alhama J, Diaz-Mendez FM, Lopez-Barea J. 1999. *Content of 8-oxodG in chromosomal DNA of Sparus aurata fish as biomarker of oxidative stress and environmental pollution*. Mutat Res 438:97-107.

- Rodriguez-Ariza A, Toribio F, López-Barea J. 1994. *Rapid determination of glutathione status in fish liver using high-performance liquid chromatography and electrochemical detection*. Journal of Chromatography B 656:311-318.
- Ruane, N.M., Carballo, E.C., Komen, J. 2002. *Increased stocking density influences the acute physiological stress response of common carp *Cyprinus carpio* (L.)*. Aquac Res 33, 777-784.
- Sangiao-Alvarellos, S., Guzman, J.M., Laiz-Carrión, R., Miguez, J.M., del Río, M.P.M., Mancera, J.M., Soengas, J.L. 2005. *Interactive effects of high stocking density and food deprivation on carbohydrate metabolism in several tissues of gilthead sea bream *Sparus auratus**. J Exp Zool Part A 303A, 761-775.
- Sayed I, Parvez S, Pandey S, Bin-Hafeez B, Haque R, Raisuddin S. 2003. *Oxidative stress biomarkers of exposure to deltamethrin in freshwater fish, *Channa punctatus* Bloch*. Ecotoxicol Environ Saf 56:295-301.
- Siraj Basha P, Usha Rani A. 2003. *Cadmium-induced antioxidant defense mechanism in freshwater teleost *Oreochromis mossambicus* (Tilapia)*. Ecotoxicol Environ Saf 56:218-221.
- Srivastava, A.K, Sahai, I. 1987. *Effects of Loading Density on Carbohydrate Metabolism and Hematology in the Indian Freshwater Catfish, *Heteropneustes fossilis**. Aquaculture 66, 275-286.
- Stephensen E, Sturve J, Forlin L. 2002. *Effects of redox cycling compounds on glutathione content and activity of glutathione-related enzymes in rainbow trout liver*. Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol 133:435-442.
- Varanka Z, Rojik I, Varanka I, Nemcsok J, Abraham M. 2001. *Biochemical and morphological changes in carp (*Cyprinus carpio* L.) liver following exposure to copper sulfate and tannic acid*. Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol 128:467-478.

2.1.B5. OBJETIVO INICIAL B.5

B.5 Valorar el efecto protector y/o inmunoestimulante en el lenguado de microorganismos probióticos.

2.2.B5. OBJETIVOS REALIZADOS

Las experiencias realizadas en cultivo larvario y destete permitieron conocer la influencia del probiótico Pdp11 *Shewanella* sp. bioencapsulado en *Artemia* y establecer un protocolo de adición adecuado.

En cuanto a las experiencias de preengorde y engorde se evaluaron los probióticos Pdp13 y Pdp11, seleccionándose éste último por ser más ventajoso en términos de calidad de los alevines producidos. Se comparó posteriormente la forma de incorporación al pienso: liofilizado y fresco mejorándose el protocolo de incorporación de este último.

2.3.B5. METODOLOGÍA

1. *Cultivo larvario y postlarvario.*

Las larvas, que procedieron de puestas del stock salvaje perteneciente al IEO (C.O. Santander), se distribuyeron en tanques circulares de 280 l con una densidad inicial de 40 larvas/l y temperatura de $18.5 \pm 0.5^\circ\text{C}$. El régimen de alimentación y cultivo se realizó basado en el protocolo del IFAPA con alguna modificación. Las microalgas utilizadas se produjeron en nuestro centro, utilizándose dos enriquecedores de *Artemia* diferentes: Super Selco DHA (Inve) y Origreen (Skretting). La coalimentación se llevó a cabo con pienso Gemma Diamond (Skretting), iniciándose el destete a días 55-58 de cultivo. Las experiencias se realizaron por triplicado.

El probiótico Pdp11, fue diariamente cultivado en placas de TSA salino a 22°C y añadido al incubador de *Artemia*, previa suspensión en una solución tamponada de PBS (10^7 ufc/ml).

Semanalmente se determinó el crecimiento en longitud y peso. Los datos fueron tratados mediante ANOVA (Statística 6 y SPSS 15). Periódicamente se tomaron muestras para la determinación de composición corporal (Linares *et al.*, 2001) en el CIMA (Galicia) y microbiota digestiva (DGGE) en la Universidad de Málaga (Kostantinov, 2003), analizándose estadísticamente los patrones de bandas mediante el programa FPQuest 4.5.

2. *Prengorde y engorde.*

Los ejemplares, producidos en el C.O. de Santander fueron distribuidos en tanques de 150, 500 ó 750l a densidades comprendidas entre 140-180 alevines/m². Los tamaños iniciales (10-80g) y temperaturas medias ($16-19^\circ\text{C}$) variaron según las experiencias. Los piensos utilizados fueron Gemma Diamond

1.2 -1.8 y Elite 2-3 (Skretting). Los probióticos Pdp11 y Pdp13 fueron incorporados al pienso según protocolo de la UMA (10^9 ufc/g) y suministrado durante 60 días ó bien durante más de siete meses. Se contrastó la forma de adición del pienso incorporándolo liofilizado y fresco. Quincenalmente se determinó el crecimiento en longitud y peso y al finalizar las experiencias se tomaron muestras para la determinación de composición corporal y microbiota digestiva mediante los protocolos ya descritos. La evolución de la microbiota fue estudiada tanto durante la incorporación del probiótico como posteriormente.

El efecto protector y/o inmunoestimulante fue valorado al término de las experiencias mediante infección experimental con *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* y *Vibrio harveyii* (i.p. ó en baño) y/o mediante la determinación de parámetros inmunológicos: actividades antiproteasa (Kim & Austin, 2006) y medida de anticuerpos específicos (Arijo *et al.*, 2004), cuya evolución fue estudiada tanto durante la incorporación del probiótico como posteriormente.

2.4.B5. RESULTADOS

1. Cultivo larvario y destete.

Se presenta una primera experiencia de adición del probiótico Pdp11 bioencapsulado en *Artemia* enriquecida con DHA-SuperSELCO (INVE) de forma continua entre los días 7 y 88 de cultivo con buenos resultados sobre el crecimiento final y la composición corporal y diferencias en la microbiota digestiva. A continuación se presenta una segunda experiencia con adición del probiótico Pdp11 bioencapsulado en *Artemia* enriquecida con ORIGREEN (Skretting) entre los días 10 y 30 de cultivo que optimiza los resultados de supervivencia y crecimiento encontrados con anterioridad.

Experiencia 1. La adición del probiótico pdp11 de forma continua entre los días 7 y 88 de cultivo:

a) Influye de manera significativa en la microbiota digestiva de postlarvas (88 DAH) (Figura 1).

b) Aumenta significativamente ($p < 0.05$) el nivel de proteínas a día 88 y de lípidos a día 115 (Figura 2) del grupo probiótico respecto del control. Esto repercute en mayores valores (ng/ μ g) de PUFAs (49.1 ± 8.1 vs 35.5 ± 6.5), MUFAs (24.0 ± 0.7 vs 17.8 ± 4.4) y $\omega 3$ (38.4 ± 8.0 vs 27.8 ± 5.9). El perfil de ácidos grasos (%) es similar para los dos grupos, excepto el índice DHA/EPA a días 43 y 115 que muestra valores significativamente mayores para el grupo control, si bien no afecta al índice DHA/EPA/ARA. (Tabla I).

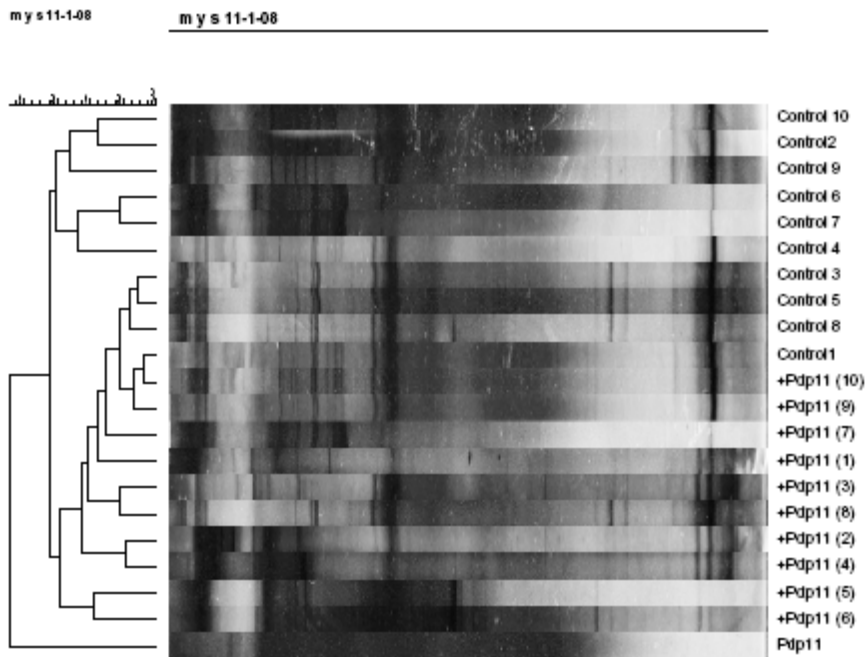


Figura 1. Análisis de la microbiota intestinal de postlarvas (88 DAH) alimentadas con *Artemia* control y con pdp11 bioencapsulado.

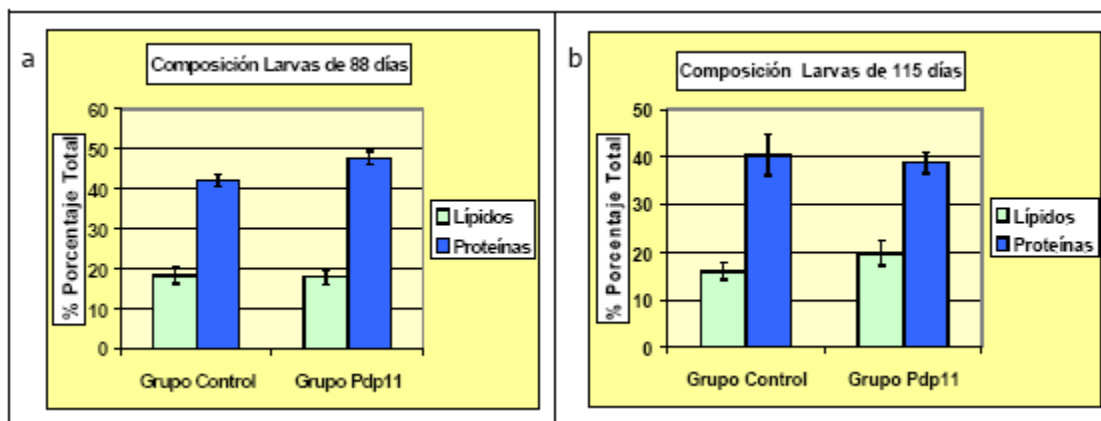


Figura 2. Composición corporal % de lípidos y proteínas totales en larvas de 88 (a) y 115 (b) días alimentadas con artemia control y artemia suplementada con probiótico pdp11 bioencapsulado.

Tabla I: Perfil de ácidos grasos (%) a día 115 de cultivo en larvas alimentadas con *Artemia* control y *Artemia* suplementada con probiótico pdp11 bioencapsulado. (Diferencias significativas $p < 0.05$).

Acido Graso	Control	Pdp11
PUFA	45,7 ± 11,6	48,3 ± 11,6
MUFA	27,4 ± 0,8	23,3 ± 11,4
SAFA	27 ± 12,4	28,4 ± 0,8
W3	34,0 ± 10,5	36,0 ± 10,5
W6	11,1 ± 1,4	11,7 ± 1,4
W3/W6	3,1 ± 0,5	3,0 ± 0,5
DHA	17,1 ± 5,0	17,1 ± 5,0
EPA	6,6 ± 2,3	7,6 ± 2,3
ARA	2,0 ± 0,2	1,8 ± 0,2
DHA/EPA	2,6 ± 0,1	2,3 ± 0,1 *
DHA/EPA/ARA	1,3 ± 0,1	1,2 ± 0,1

c) Aumenta significativamente ($p < 0.05$) el crecimiento en longitud y peso húmedo en un 38% a partir del destete, con menor dispersión de peso húmedo (9.7 vs 12.3%).

d) La supervivencia obtenida al finalizar la experiencia fue mayor para el grupo control (58.2 vs 45.8 %) y conduce a implementar el protocolo de adición del probiótico.

Experiencia 2. La adición del probiótico pdp11 bioencapsulado en *Artemia* entre los días 10 y 30 de cultivo:

a) Aumenta significativamente ($p < 0.05$) el crecimiento en peso seco entre los días 20 y 41 de cultivo y en longitud a partir de éste momento, promoviendo además un crecimiento mayor en peso húmedo desde destete (Figura 3).

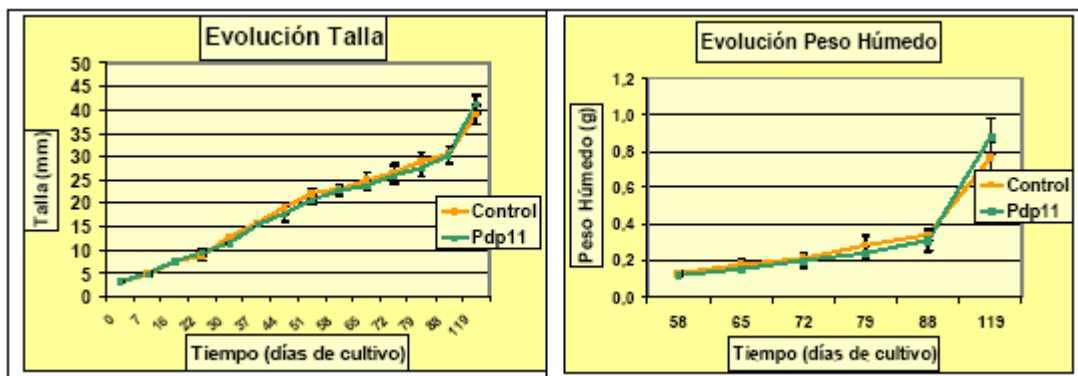


Figura 3: Evolución de peso seco (mg) y húmedo (g) a lo largo de la experiencia en larvas y postlarvas de lenguado senegalés con un alimentación control y probiótico bioencapsulado en artemia (10-30 DAH).

b) Promueve un adelanto en la metamorfosis (24-48 h) y una disminución de la erosión en la aleta caudal, así como una mayor rapidez de recuperación. Este efecto será estudiado con más profundidad en 2009.

c) No presenta diferencias en las supervivencias obtenidas ($84.5 \pm 2.9\%$ vs $86.8 \pm 1.4\%$ para el control), que en ambos grupos fueron sensiblemente superiores a las registradas en anteriores experiencias.

d) Existen análisis pendientes de microbiota digestiva y composición corporal, realizados en esta ocasión a lo largo del cultivo y que habrán de ampliar la información sobre las ventajas en el crecimiento.

2. Experiencias de preengorde y engorde.

Se realiza una primera experiencia en la que se comparan los probióticos Pdp11 y Pdp13 liofilizados incorporados al pienso, confiriendo ambos protección frente a *Photobacterium damsela* subsp *piscicida* (i.p.) y presentando los ejemplares alimentados con Pdp11 una mejor composición corporal y condición histológica.

Se lleva a cabo una segunda experiencia de adición del probiótico Pdp11 fresco en el mismo pienso observándose de nuevo protección frente a *Photobacterium* sp (i.p.) y mayor crecimiento.

Seguidamente se realiza un tercer ensayo para comparar las dos formas de adición del Pdp11 (fresco y liofilizado) y no se obtienen resultados concluyentes en la infección experimental con *Photobacterium* sp. en baño, destacando el posible efecto inmunoestimulante del alginato, así como la necesidad de mejorar el protocolo de incorporación del Pdp11 fresco a pienso.

Una vez modificado este protocolo, en la cuarta experiencia se comparan ambos probióticos frescos (Pdp11 y Pdp13) suministrados durante más de siete meses, no observándose diferencias frente a infección experimental con *Vibrio harveyi* (en baño e i.p.), ni tampoco en los parámetros inmunológicos específicos (ELISA) para el Pdp11 y registrándose una actividad antiproteasa superior para el grupo Pdp13; en esta experiencia se analiza también la evolución de la microbiota digestiva encontrándose una sucesión a lo largo del tiempo de adición.

En la quinta experiencia el Pdp11 añadido desde cultivo larvario y liofilizado durante el preengorde, produce una mayor supervivencia, así como produce protección frente a infección experimental con *Photobacterium* sp. (i.p.) al cabo de diez meses de adición aunque menor a la registrada con anterioridad y no afecta a los parámetros inmunológicos estudiados.

Por último se realiza una sexta experiencia en preengorde para determinar la influencia de los tiempos y formas de incorporación del Pdp11 en pienso sobre el crecimiento, la evolución de la microbiota digestiva, la protección frente a

Photobacterium sp. (i.p.) y los parámetros inmunológicos (ELISA, actividad antiproteasa, complemento y lisozima).

Experiencia 1. La adición de los probióticos Pdp11 y Pdp13 liofilizados en pienso Gemma 1.8 (Skretting) durante 69 días ($16.5 \pm 1^\circ\text{C}$):

a) Confiere protección frente a infección experimental (i.p.) con *Photobacterium damsela* Subsp. *piscicida* con unos porcentajes relativos de supervivencia (RPS) de 32.5% y 27.5% para los grupos Pdp13 y Pdp11 respectivamente.

b) Presenta similar crecimiento que el control para Pdp11 y significativamente menor para Pdp13.

c) Aumenta de forma significativa ($p < 0.05$) el nivel de proteína en músculo con respecto al grupo control para la dieta Pdp13. No se encuentran diferencias significativas en lípidos totales para ambos probióticos ni en músculo ni en hígado.

d) En cuanto al perfil de ácidos grasos (%) en músculo los ejemplares alimentados con Pdp13 presentan valores de w6 significativamente mayores ($p < 0.05$) que los alimentados con Pdp11. Este perfil en hígado muestra valores significativamente mayores de w6, ácidos linoleico y linolénico para ambos probióticos, presentando los alevines alimentados con Pdp13 valores significativamente mayores de MUFAS y significativamente menores de DHA. El índice DHA/EPA/ARA no presenta diferencias significativas tanto en músculo como en hígado para las tres dietas estudiadas (Tabla II).

Tabla II: Perfil de ácidos grasos (%) de músculo e hígado de ejemplares alimentados con una dieta control y suplementada con probióticos Pdp11 y Pdp13 liofilizados.

Acido graso	MÚSCULO CONTROL	MÚSCULO Pdp11	MÚSCULO Pdp13	HÍGADO CONTROL	HÍGADO Pdp11	HÍGADO Pdp13
PUFAS	47.0 ± 1.0	44.2 ± 5.6	45.4 ± 5.2	43.5 ± 3.5	42.0 ± 1.5	41.2 ± 4.0
SAFAS	26.8 ± 4.2	27.8 ± 2.1	26.3 ± 1.6	27.5 ± 1.3	25.8 ± 2.2	25.6 ± 2.9
MUFAS	26.2 ± 3.4	28.0 ± 3.7	28.3 ± 3.9	28.9 ± 2.6 ^a	32.2 ± 1.9 ^{ab}	33.2 ± 1.6 ^b
W3	40.4 ± 0.5	37.7 ± 5.9	38.4 ± 5.5	35.4 ± 2.8	32.6 ± 1.4	31.5 ± 3.8
W6	5.9 ± 0.5 ^a	5.9 ± 0.2 ^a	6.3 ± 0.1 ^b	7.3 ± 0.9 ^a	8.6 ± 0.4 ^b	8.8 ± 0.3 ^b
W3/W6	6.9 ± 0.5	6.4 ± 1.0	6.1 ± 0.9	4.9 ± 0.3	3.8 ± 0.2	3.6 ± 0.3
DHA	22.9 ± 2.9	22.4 ± 6.1	22.5 ± 5.8	21.4 ± 1.6 ^a	19.3 ± 1.3 ^{ab}	17.3 ± 0.7 ^b
EPA	8.1 ± 1.6	6.9 ± 0.4	7.1 ± 0.4	4.1 ± 1.2	4.0 ± 0.8	4.1 ± 1.3
ARA	1.6 ± 0.3	1.5 ± 0.5	1.6 ± 0.5	2.3 ± 1.0	1.8 ± 0.4	1.7 ± 0.2
DHA/EPA	3.0 ± 1.0	3.2 ± 0.9	3.1 ± 0.7	5.6 ± 1.5	5.0 ± 1.0	4.5 ± 1.2
DHA/EPA/ARA	1.8 ± 0.5	2.2 ± 0.2	2.0 ± 0.2	2.8 ± 1.3	2.9 ± 1.1	2.7 ± 0.9

e) La alimentación con Pdp11 disminuye el número y tamaño de vacuolas grasas en hígado y enterocitos frente a la dieta control y la suplementada con Pdp13 (Figuras 4, 5). Este efecto fue más acusado para el hígado (Tabla III).

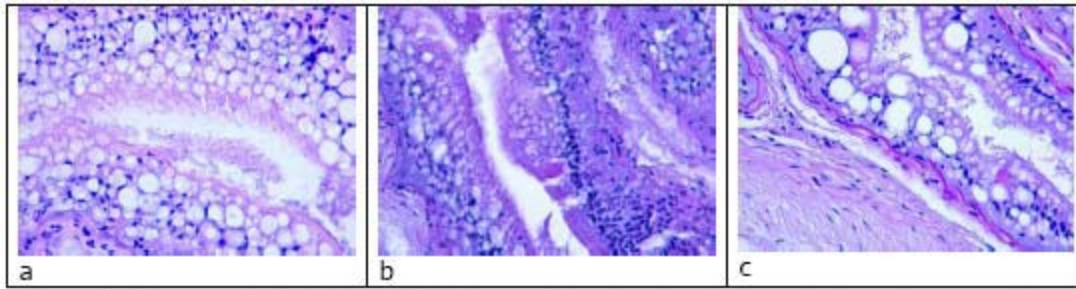


Figura 4: Almacenamiento lipídico (400X) en enterocitos de alevines de lenguado senegalés alimentados con una dieta control (a), Pdp11 (b) y Pdp13 (c).

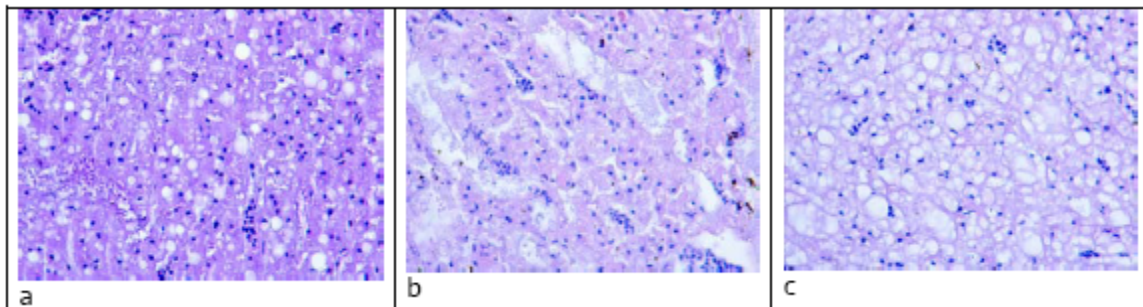


Figura 5: Vacuolas grasas (400X) en hígado de alevines de lenguado senegalés alimentados con una dieta control (a), Pdp11 (b) y Pdp13 (c).

Tabla III: Diferencias en la deposición grasa (%) de las tres dietas estudiadas.

	Grupo		
	Control	Pdp11	Pdp13
Hígado	56,34%	20,70%	52,04%
Tracto digestivo	55,36%	43,33%	57,14%

f) Se observa gran similitud en la microbiota intestinal de ejemplares alimentados con ambos probióticos Pdp11 y Pdp13 respecto al control.

g) A partir de éstos resultados se selecciona el probiótico Pdp11 frente al Pdp13.

Experiencia 2. La adición de Pdp11 fresco en pienso Gemma 1.8 (Skretting) según protocolo inicial durante dos meses ($18 \pm 1^\circ\text{C}$)

a) Confiere protección frente a infección experimental (i.p.) con *Photobacterium* sp. con un porcentaje relativo de supervivencia (RPS) de 43.5%.

b) Aumenta significativamente ($p < 0.05$) el crecimiento en longitud y peso (Tabla V).

Tabla V: Crecimiento de ejemplares de lenguado senegalés tras alimentación con una dieta control y otra suplementada con pdp11 fresco (diferencias significativas $p < 0.05$)

Parámetros	Control	Pdp11 fresco
Peso inicial (g)	23,4 ± 7,7	24,4 ± 9,2
Peso final (g)	34,50 ± 12,3	37,8 ± 15,0
Tasa de crecimiento diario (% día-1)	0,9 ± 0,0	1,1 ± 0,0*
Tasa de crecimiento absoluto (g día-1)	0,2 ± 0,0	0,3 ± 0,0*
Biomasa inicial (g)	4214,8 ± 415	4383,8 ± 475
Biomasa Final (g)	6210,6 ± 682	6810,1 ± 739
Producción Neta (g)	1995,8 ± 503	2426,3 ± 542
Supervivencia (%)	100	100

c) No afecta a la composición corporal de los dos grupos estudiados ($p < 0.05$).

Experiencia 3. Comparación de suministro del probiótico pdp11 fresco y liofilizado a pienso ELITE (Skretting) durante 73 días ($18.3 \pm 1^\circ\text{C}$):

a) No se obtienen resultados concluyentes en infección experimental (en baño) con *Photobacterium* sp, aunque sí un posible efecto inmunoestimulante del alginato.

b) Significativa menor tasa de crecimiento para Pdp11 fresco (0.78 ± 0.01 versus 1.15 ± 0.13 para control, 1.00 ± 0.09 para control alginato y 1.03 ± 0.16 para pdp11 liofilizado con alginato), relacionada con excesiva humedad del pienso y dificultad en su conservación, que lleva a una mejora del protocolo de incorporación en fresco con la adición de alginato cálcico.

c) No existen diferencias significativas en la microbiota digestiva (DGGE) entre los patrones de bandas de los cuatro grupos estudiados, si bien existe mayor similitud entre los dos grupos que llevan alginato (Pdp11 liofilizado y control alginato).

Pearson correlation [0.0%-100.0%]
1 1



Figura 6. Análisis microbiota intestinal a lo largo de la experiencia en alevines alimentados con pienso control y suplementado con alginato, pdp11 fresco y liofilizado.

Experiencia 4. La adición de Pdp11 y Pdp13 fresco según protocolo nuevo adicionado de forma continua y discontinua durante más de siete meses ($18 \pm 0.5^\circ\text{C}$):

a) No confiere protección frente a infección experimental con *Vibrio harveyii* (i.p. ó en baño).

b) Existe una significativa mayor actividad antiproteasa ($p < 0.05$) para los ejemplares alimentados con Pdp13 fresco (Figura 7). No así para el grupo Pdp11 fresco.

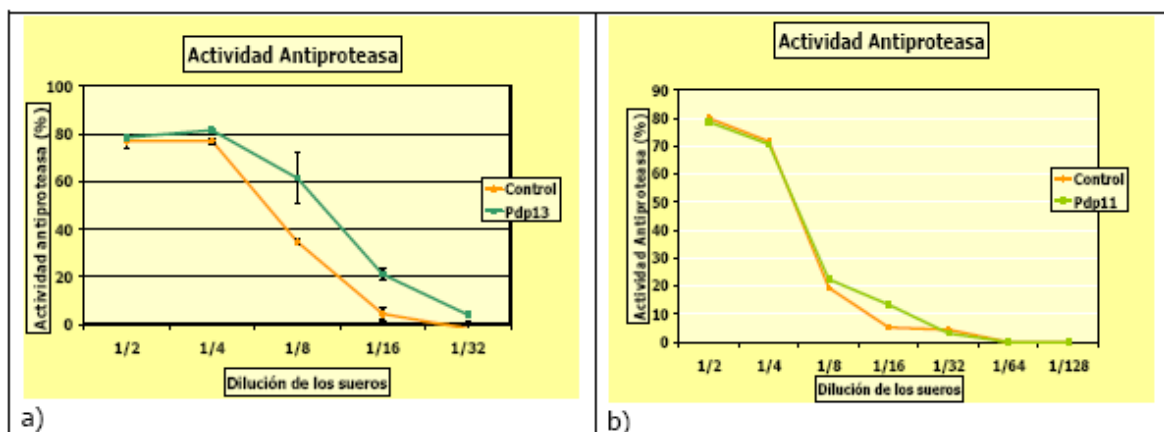


Figura 7. Diferencias significativas en la actividad antiproteasa determinada en suero de individuos alimentados con pienso control y pienso suplementado con Pdp13 fresco (a), no encontradas en los sueros de los grupos control y Pdp11 fresco (b).

c) Presenta gran similitud en la microbiota intestinal de los ejemplares alimentados con los dos probióticos respecto al control. Se observa la existencia de una sucesión en la microbiota a lo largo del tiempo, (Figura 8).

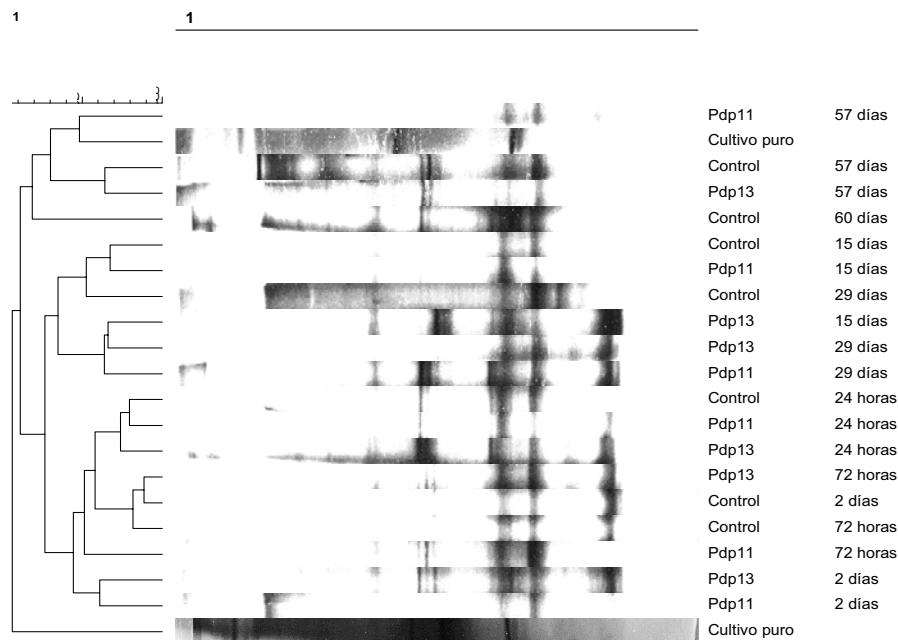


Figura 8. Análisis microbiota intestinal a lo largo de la experiencia en alevines alimentados con pienso control y suplementado con Pdp11 y Pdp13 frescos.

d) No se encuentran diferencias significativas ($p < 0.05$) en la composición corporal (proteínas, lípidos y perfil de ácidos grasos) de músculo e hígado para ambos grupos.

Experiencia 5. La adición continuada de probiótico Pdp11 bioencapsulado en artemia en cultivo larvario e incorporado liofilizado en pienso en preengorde y engorde durante siete meses:

a) Aumenta la supervivencia durante el preengorde con valores de 99.7 frente a 71.9 % para el grupo control.

b) Confiere protección frente a infección experimental con *Photobacterium* sp (i.p.) sí bien, los índices de supervivencia relativa (RPS) encontrados fueron menores que los registrados en experiencias de menor tiempo de adición, (20% para la adición discontinua y 10% para la continua).

Experiencia 6. Comparación de suministro del probiótico Pdp11 fresco y liofilizado a pienso Gemma 1.8 Diamond (Skretting) durante 60 días ($18 \pm 0.5^\circ\text{C}$): crecimiento y evolución de la respuesta frente a infección experimental, inmunológica y respuesta al estrés (Nitritos).

Esta experiencia está aún en curso. No pudiéndose presentar resultados en la actualidad.

2.5.B5. CONCLUSIONES

La utilización de Pdp11 bioencapsulado en *Artemia* durante los días 10 al 30 del cultivo larvario de lenguado senegalés favorece el desarrollo, crecimiento y la composición corporal de larvas y postlarvas e influye en la microbiota digestiva, por lo que puede considerarse una estrategia eficaz en la producción.

Ambos probióticos Pdp11 y Pdp13 administrados en preengorde y engorde durante 60 días confieren protección frente a infección experimental con *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* (i.p.). A pesar de pertenecer ambos al género *Shewanella*, presentan diferente comportamiento respecto al crecimiento, composición corporal de músculo e hígado, condición del digestivo e hígado e inmunología de alevines, siendo más ventajoso Pdp11 en los parámetros anteriormente mencionados, excepto en el nivel de proteínas en músculo y actividad antiproteasa. Por lo tanto se selecciona Pdp11 como probiótico eficaz en estas etapas de cultivo.

Respecto a la forma de adición fresca o liofilizada se observa que ambas promueven mayor resistencia frente a *Photobacterium* sp., encontrándose diferencias en el crecimiento de los ejemplares, mayor con la forma fresca, pero similar con la liofilizada, quizás debido a la dificultad de recuperación con la baja temperatura del ensayo.

2.6.B5. VALORACIÓN

Los resultados correspondientes al cultivo larvario han de completarse con un estudio de la vitalidad a término (1g), así como optimizarse el protocolo con una segunda dosis de probiótico encapsulado en pienso, enfrentando la plataforma de crecimiento observada entre los días 70 y 90. Se estima de interés estudiar tanto el adelanto de la primera dosis de probiótico como el del inicio del destete, con las ventajas económicas derivadas para el sector acuícola de nuestro país.

En preengorde y engorde, el protocolo de adición del Pdp11 fresco presentó problemas de humedad y fue mejorado con la incorporación de alginato cálcico.

Se observó un descenso en el efecto protector frente a patógenos y en la respuesta inmune al aumentar el tiempo de adición del probiótico. Se está estudiando en la actualidad la evolución de estos parámetros a lo largo del suministro del probiótico y con posterioridad al mismo, a fin de optimizar los protocolos; asimismo se está realizando un estudio de la respuesta adaptativa frente al estrés (NO_2^-).

2.7.B5. DIFUSIÓN

PUBLICACIONES

García de la Banda I., Lobo C., León-Rubio J.M., Balebona M.C., Moriñigo M.A., Moreno-Ventas X., Linares F., Arce F. & Arijó S. 2009 “Effect of dietary administration of two closely related probiotics on growth of Senegalese sole (*Solea senegalensis* Kaup, 1854)”. *Aquaculture Nutrition*. *En prensa*

COMUNICACIONES PRESENTADAS A CONGRESOS

García de la Banda I., Lobo C., Martín I., Moriñigo M.A., Arijó S., León-Rubio J.M., Tapia-Paniagua S., Chabrilón M., Pazos G., Linares F., Moreno-Ventas X. & Canteras J.C. Noviembre 2008. “Pdp11 probiotic use on *Solea senegalensis* (Kaup) larval and postlarval culture”. Comunicación oral presentada en el “IV Workshop The Cultivation of Soles”. Publicada en el libro de Abstracts of the “IV Workshop The cultivation of Soles” pág 19. Faro (Portugal).

García de la Banda I., Lobo C., Moriñigo M.A., Chabrilón M., León-Rubio J.M., Arijó S., Tapia-Paniagua S., Pazos G., Linares F. & Moreno-Ventas X. Septiembre 2008. “Effect of pdp11 probiotic bioencapsulated in *Artemia salina* on senegal sole *Solea senegalensis* (Kaup, 1858) larval and postlarval culture”. Póster presentado en el Congreso Europeo de Acuicultura. Publicado en el libro de Abstracts of the European Aquaculture Meeting 2008. *in press*. Cracovia (Polonia).

Martínez-Manzanares E., Tapia-Paniagua S., Balebona M.C., García de la Banda I., Lobo C. & Moriñigo M.A. Noviembre 2008. “Influence of probiotic microorganisms on the microbiota of Senegalese sole (*Solea senegalensis*) specimens”. Comunicación oral presentada en el “IV Workshop The Cultivation of Soles”. Publicada en el libro de Abstracts of the “IV Workshop The cultivation of Soles” pág 18. Faro (Portugal).

Roque A., Dogankaya L., Furones D., Duncan N., Salas E., García de la Banda I., Cañavate J.P., Lobo C. & Gómez-Gil B. Noviembre 2008. “Analysis of the vibrios isolated from the Senegalese sole (*Solea senegalensis*) cultured in three different localities of Spain”. Comunicación oral presentada en el “IV Workshop The Cultivation of Soles”. Publicada en el libro de Abstracts of the “IV Workshop The cultivation of Soles” pág 16-17. Faro (Portugal).

García de la Banda I.; Lobo C., Moriñigo M.A., Chabrilón M., León-Rubio J.M., Arijó S. Balebona M.C., Linares F., Pazos G., Moreno-Ventas X., Lucas M.L., Arce F. & Nicolás M. Octubre 2007. “Influence of lyophilized pdp11 and pdp13 probiotics on on-growing of senegal sole *Solea senegalensis* (Kaup 1858)”. Póster presentado en el Congreso Europeo de Acuicultura. Publicado en el libro de Abstracts of the European Aquaculture Meeting 2007 pág 203. Estambul (Turquía).

García de la Banda I.; Lobo C., Recalde L., León-Rubio J.M., Moriñigo M.A., Arijó S., Chabrillón M., Díaz-Rosales P., Balebona M.C., Martínez-Manzanares E., Arce F., Nicolás M., Lucas M.L., Pazos G. y Linares F. Septiembre 2007. "Influencia de la adición del probiótico pdp11 en el engorde del lenguado senegalés *Solea senegalensis* (Kaup 1858)". Póster presentado en el XI Congreso Nacional de Acuicultura. Publicado en el libro de Resúmenes del XI Congreso Nacional de Acuicultura pág 1241-1244. Vigo.

García de la Banda I.; Lobo C., Chereguini O., Moriñigo M.A., Chabrillón M., León-Rubio J.M., Arijó S., Linares F., Pazos G., Mira J.R., Canteras J.C. Moreno-Ventas X. & Arce F. Marzo 2006. "Effect of probiotic pdp11 on ongrowing of senegal sole *Solea senegalensis* (Kaup, 1858)". Comunicación oral presentada al "III Sole Workshop on sole culture". Publicado en el libro de Abstracts of the "III Workshop on sole culture" pág 19-20. CIEFP El Toruño (Cádiz).

García de la Banda I.; Lobo C., Chereguini O., Linares F., Pazos G. & Moreno-Ventas X. Mayo 2006. "Effect of probiotic pdp11 on ongrowing of senegal sole *Solea senegalensis* (Kaup, 1858)". Poster presentado en el Congreso Europeo de Acuicultura. Publicado en el libro de Abstracts of the European Aquaculture Meeting 2006 pág 333. Florencia (Italia).

2.8.B5. INCIDENCIAS DE DESARROLLO

La experiencia 6 de preengorde está aún en curso debido a la imposibilidad de su realización en 2007-2008 por una serie de dificultades ya descritas en el informe anual de 2007.

2.9.B5. BIBLIOGRAFÍA

- Arijó S., Balebona M.C., Martínez Manzanares E. and Moriñigo M.A. 2004. Inmune response of gilt-head seabream (*Sparus aurata*) to antigens from *Photobacterium damsela* subs. *Piscicida*. Fish & Shellfish Immunology 16, 65-70.
- Kim D.H. & Austin B. 2006. Innate immune responses in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum), induced by probiotics. Fish & Shellfish Immunology 21, 513-524.
- Konstantinov, S.R., Zhu W.Y., Williams B.A., Tamminga S., De Vos W.M., Akkermans A.D.L. 2003. Effect of fermentable carbohydrates on faecal bacterial communities as revealed by DGGE analysis of 16S rDNA. FEMS Microbiol Ecol. 43, 225-235.
- Linares, F., Olmedo, M., Peleteiro, J.B. & Arán Echabe, J. 2001. Ongrowing and biochemical composition of blackspot sea bream (*Pagellus bogaraveo*) juveniles fed with different dry food. European Aquaculture Society. Special publication nº 30, 318-321. Eds. Hendry C.I., Van Stappen G., Wille M. & Sorgeloos P.

3.- ANEXOS CON LOS INFORMES DE LOS DISTINTOS GRUPOS DE TRABAJO (estos informes podrán tener el formato que determine cada grupo de trabajo, incluidos sus logotipos oficiales).

Se adjuntan documentos con los correspondientes informes globales para cada Comunidad Autónoma.