

ANEXO IV

JACUMAR
JUNTA NACIONAL ASESORA DE CULTIVOS MARINOS

PLANES NACIONALES DE CULTIVOS MARINOS

INFORME FINAL

**Título: Bases para el control de la reproducción
conocimiento del sistema de defensas naturales en el
lenguado (*Solea senegalensis*)**

RESUMEN EJECUTIVO

1.- DATOS ADMINISTRATIVOS

TITULO: Bases para el control de la reproducción y conocimiento del sistema de defensas naturales en el lenguado (*Solea senegalensis*).

FECHAS DE REALIZACIÓN: 2009-2011

DATOS DEL COORDINADOR DEL PROYECTO

Nombre y Apellidos: José Pedro Cañavate Hors
Organismo/ Centro: IFAPA Centro El Toruño. Junta de Andalucía
Correo electrónico: josep.canavate@juntadeandalucia.es

Comunidades Autónomas participantes

Andalucía, Canarias, Cantabria, Cataluña, Galicia, Valencia.

2.- RESULTADOS TECNICOS DEL PLAN NACIONAL

2.1. OBJETIVOS

- A. Conseguir reproducción controlada en cautividad con ejemplares de lenguado procedente de cultivo
 - A.1. Búsqueda de terapias hormonales para facilitar ovulación, espermiación y desove natural.
 - A.2. Desarrollar técnicas para conseguir la reproducción artificial
 - A.3. Establecer fuentes de variabilidad que afectan a la reproducción de ejemplares de cultivo

- B. Determinar condiciones de cultivo para una óptima respuesta inmune y resistencia a patógenos en juveniles.
 - B.1. Establecer niveles de referencia para evaluar la respuesta inmune.
 - B.2. Evaluar las modificaciones de la respuesta inmune por las condiciones de manejo en cultivo.
 - B.3. Conseguir protocolos eficaces de prevención de enfermedades.

2.3. METODOLOGÍA

Establación de reproductores en nave de cultivo con tanques circulares de diversos tamaños, fabricados en de fibra de vidrio, de color gris oscuro, sin sustrato arenoso, de 28.000 4.000, 3.000 y 2.000 L de capacidad. Tanques

expuestos a fotoperiodo natural todo el año y tapados con malla para evitar exposición excesiva a la luz solar durante el día. Circuito abierto de agua marina, con flujo que proporciona una renovación del 20% por hora. Animales mantenidos a temperatura natural todo el año (entrada de agua de mar), excepto los meses de verano (julio-septiembre) en que ésta se atenúa a un máximo de 21°C. La densidad de cultivo se mantiene entre 3 y 5 kg/m². Creación, mantenimiento y gestión de stocks de lenguado salvajes y F-1 (nacidos en criadero). Control de termoperíodo en diente de sierra para inducción de puestas.

Inducción de la ovulación de hembras en estado de madurez gonadal E3 mediante inyección o implante de GnRha. Valoración de viabilidad, volumetría y pH del líquido gonadal de puestas obtenidas mediante masaje abdominal. Fecundación artificial de huevos con espermatozoides criopreservados. Formación de poblaciones mixtas de reproductores salvajes y F1. Alimentación de F1 con distintas dietas y determinación de la calidad de los gametos y nivel de esteroides.

Grabación con video digital para registrar y analizar el comportamiento de reproductores de lenguado de diferentes orígenes y aplicando el análogo de la hormona liberadora de gonadotropina (GnRH_a) y Prostaglandina F2 α (PGF2 α). Experimentos de alimentación con dietas para examinar el efecto de diferentes niveles dietéticos de ácido araquidónico (ARA) en la composición nutricional y fisiología reproductiva del lenguado F1.

Experimentos de engorde de lenguado senegalés utilizando alimentos enriquecidos con probiótico Pdp11 (10⁹ufc/g) durante 60 días. Comparación de diferentes modos y tiempos de adición del probiótico así como diferentes densidades de cultivo. Aplicación de estrés agudo final puntual ó continuado. Determinación periódica de parámetros metabólicos e inmunológicos, microbiota intestinal, histología de intestino e hígado. Realización de infecciones experimentales con *P. damselae* subsp. *piscicida* i.p. (2.4*10⁵ufc/g). Experimentos de cultivo de engorde con dietas diferentes, isoproteicas (50% de proteína) con dos porcentajes diferentes de lípidos 8 y 16 %. Ensayos de sustitución del 95% de harina de origen animal por vegetal en sistemas de cultivo abierto y con recirculación de agua.

Análisis de 343 cepas bacterianas para estudio de la inhibición del crecimiento del patógeno *Vibrio harveyi*.

Uso de marcadores genómicos de procesos metabólicos relacionados con la respuesta a estrés (expresión de genes relacionados con los receptores de glucocorticoides y producción de eicosanoides) para estudiar la capacidad del lenguado de adaptación a diferentes condiciones de estrés en cultivo. Estudio de la modulación nutricional y las variaciones térmicas en esta especie.

Determinación de los niveles de referencia para evaluación de la respuesta inmune del lenguado mediante desarrollo de ensayos de estimulación inmune y validación, secuenciación de transcriptoma mediante NGS, regulación de la expresión génica a LPS y modulación de la expresión génica por corticoides como

mediadores de la respuesta de estrés. Comparación de niveles de expresión de genes del sistema inmune innato entre sistema intensivo y extensivo de producción.

Cultivo larvario para estudiar la expresión de los distintos genes durante el desarrollo larvario y toma de muestras de larvas cada 2 días, desde los 2 días hasta los 21 días tras la eclosión. Monitorización de la ontogenia del sistema inmune innato utilizando la lisozima g, la hepcidina y la fracción C3.

Evaluación de efecto de la temperatura (17°C, 20°C y 22°C) sobre la proporción de sexos de huevos recién fecundados, durante un periodo de 48 h, hasta su eclosión, y durante la metamorfosis (16°C y 20°C).

2.4. RESULTADOS

El uso de diferentes dosis de hCG afectó a la secreción de esteroides y producción de esperma. En lenguados sin tratar, los niveles plasmáticos de esteroides sexuales no variaron a lo largo del experimento. El tratamiento hCG con 1.000 iu/kg, pero no con 250 y 500 iu/kg, indujo elevación en los niveles de andrógenos (11KT y T). Sobre los niveles de MIS, se observó una elevación a día 14 en los grupos tratados con 500 y 1.000 iu/kg. Independientemente de la dosis administrada, el mayor efecto sobre la secreción de esteroides se observó a las dos semanas después de iniciar los tratamientos.

Respecto a los parámetros espermáticos, se observó una estimulación en la producción de esperma (volumen) en los machos tratados con las dosis altas (500 y 1000 iu/kg) con respecto a la dosis menor y controles, aunque esta diferencia no fue estadísticamente significativa ($p < 0.05$). La densidad y movilidad espermática no se vió afectada por los tratamientos hCG. Todas las dosis hCG aplicadas sobre los machos tienen el efecto de estimular la puesta de huevos en las hembras de la población, siendo este efecto mayor en el grupo tratado con 250, que con 500 y 1.000 IU. En resumen, puede recomendarse una dosis hCG de 500 IU/kg para el tratamiento de los machos F1, con el fin de conseguir una estimulación adecuada de diversos parámetros reproductivos.

Cuando se estudió la dosis óptima de GnRHa ([D-Ala6, Pro9Net]-LHRH, Bachem) para la aplicación de terapias hormonales sobre la secreción de esteroides y ovulación en hembras, se observó que los tratamientos GnRHa no afectaron los niveles plasmáticos de VTG en hembras. Esto fue esperable, ya que la síntesis de VTG está ligada al proceso de vitelogénesis, previo a la posterior maduración y ovulación de los oocitos, procesos más sensibles al efecto estimulador de los tratamientos GnRHa. Los esteroides sexuales sí sufrieron modificaciones significativas al estímulo GnRHa. Todas las dosis GnRHa indujeron elevación inmediata de los niveles de E2 hasta niveles máximos detectados a 11 h post-tratamiento (pt) y manteniéndose invariables y superiores a los controles a partir de entonces y hasta el final del periodo experimental. Dosis intermedias (15 ug/kg) se revelan como óptimas, produciendo mayor estimulación inmediata y más sostenida en el tiempo. De forma similar, todos los tratamientos

GnRHa estimularon la secreción de T, observándose elevación de T plasmática a las 5 h pt, aunque ésta sólo fue significativamente diferente del control ($p < 0,05$) para la dosis de 5 $\mu\text{g}/\text{kg}$. El análisis de T apunta igualmente a la dosis de 15 $\mu\text{g}/\text{kg}$ como óptima, ya que produce una inducción de T rápida y prolongada en el tiempo y de grado similar o mayor a la obtenida con dosis mayores.

El tratamiento prolongado de reproductores F1 con implantes GnRHa de dosis baja, aplicado desde fases tempranas del desarrollo gonadal (vitelogénesis), estimula la maduración oocitaria y ovulación en hembras, pero no produce un efecto significativo sobre la producción de esperma en machos y, lo que es más importante, no consigue promover la fecundación de huevos.

El estudio comparativo entre reproductores mantenidos en fotoperiodo natural (control) o fotoperiodo constante muestra que éstos últimos producen puesta de huevos espontánea en la misma época que los controles y con similares características de fecundidad. Esto sugiere la existencia de un ritmo endógeno de reproducción en el lenguado, que persiste en ausencia de la señal lumínica de fluctuación anual del fotoperíodo y apuntaría a un papel predominante de la temperatura en regular la puesta de huevos en esta especie.

El estudio comparativo entre reproductores F1 alimentados de forma diferente (natural frente a pienso) indica diferencias en la secreción de esteroides sexuales durante el desarrollo gonadal. Se hace patente una mayor secreción de E2 en hembras y de 11KT en machos durante la gametogénesis en reproductores F1 alimentados de forma natural con respecto a aquellos alimentados con pienso. Esto podría indicar un efecto negativo de la alimentación con pienso sobre el sistema endocrino que podría afectar al correcto desarrollo de los procesos de gametogénesis y maduración y así a la cantidad y calidad de gametos.

Se confirma en diversas instalaciones distribuidas por la geografía nacional que, a partir de la estabulación en cautividad de lenguados reproductores de origen salvaje y nacidos en cautividad, se obtienen puestas naturales. Estas son viables en el caso de los ejemplares salvajes, y no viables para los reproductores F1.

No existe comportamiento reproductivo en los grupos de lenguados F1, independientemente del tratamiento con GnRHa o PGF2 α , y las puestas producidas no están fecundadas. Cuando en el grupo estabulado se introducen machos salvajes y hembras F1 y F2 si se observa comportamiento reproductivo y se recogen puestas fecundadas. Los niveles dietéticos de 2.3-3.2% ARA (de ácidos grasos totales) cambiaron la composición nutrición y fisiología reproductiva del lenguado F1 a una composición y fisiología parecido al lenguado salvaje.

Para conseguir la fecundación artificial, se evaluó el método de administración de la terapia hormonal, comparando el implante y la inyección. La producción relativa de huevos en ejemplares F1 fue mayor con inyecciones consecutivas, separadas una semana ($574,9 \pm 67,2 \times 10^3$ huevos/ Kg hembra) que con un implante ($134,6 \pm 40,9 \times 10^3$ huevos/Kg hembra) y la calidad era similar. Se determinó que el tiempo de ovulación de hembras en estado de maduración E3 tratadas a las 12

a.m. mediante inyección 25 ugr/kg de LHRHa a 16°C era 41-44 horas. Con este protocolo se pueden obtener huevos que al ser fecundados dan tasas medias de fecundación y eclosión de $36,41 \pm 2,89$ y $20,21 \pm 2,85$, respectivamente. Además, la calidad del huevo se mantiene dentro del ovario durante tres horas, según muestran las tasas de fecundación y eclosión obtenidas. La hora de aplicación del tratamiento hormonal no afecta al tiempo de ovulación pero sí a la calidad del huevo, obteniéndose mejores tasas de fecundación y eclosión cuando se realizó a las 6h o 12h a.m. ($23,1 \pm 2,8$ y $16,6 \pm 2,7$ o $31,0 \pm 3,7$ y $14,4 \pm 2,6$, respectivamente) frente a las obtenidas a 19h p.m. ($7,0 \pm 1,5$ y $4,8 \pm 1,6$). Para incrementar la producción de huevos/ Kg de hembra se sugiere que dos inyecciones hormonales separadas 7 o 15 días seguidas de un descanso de 15-30 días y otras dos inyecciones permitirían obtener varias puestas por hembra sin disminuir la calidad del huevo. La estabulación mixta de F1 y salvajes en dos tanques (A: machos salvajes y hembras cultivadas F1 y F2 ; B: hembras salvajes y machos cultivados F1 y F2) durante dos años ha permitido obtener puestas fecundadas naturales en el tanque A con tasas de fecundación y eclosión del $56,72 \pm 9,72$ y 100, respectivamente. Estos resultados sin tratamiento hormonal confirman que los machos F1 son los principales responsables de las disfunciones sexuales, s como Control. La movilidad del esperma en lenguados salvajes es superior a la de ejemplares F1 alimentados con dieta natural, y la movilidad y densidad de los salvajes es superior a la de los F1 que reciben dieta comercial. Respecto a los huevos, las hembras F1 hormonadas alimentadas con dieta natural presentan mejores tasas de fecundación y eclosión que con dieta comercial.

Las diferencias de crecimiento registradas en juveniles de lenguado cultivados bajo dos sistemas de circulación del agua sugieren que el crecimiento de esta especie es mucho más rápido utilizando sistemas de recirculación de agua.

La incorporación del probiótico Pdp11 en fresco ha permitido verificar su eficacia en pulsos de 15 días con ejemplares de lenguado senegalés en preengorde y engorde. Se ha comprobado que los ejemplares alimentados con Pdp11 fresco presentan una protección frente a patógenos y una mejor condición inmunológica y metabólica. La modulación de la microbiota intestinal ejercida por el probiótico se detecta a los 21 días del inicio de su suministro, sufriendo dicho efecto un retraso en el cultivo a alta densidad. Se confirma que el cultivo en estas condiciones aumenta la susceptibilidad a enfermedades oportunistas y reduce el bienestar de los ejemplares. Estos efectos negativos también se van a ver reflejados en una respuesta inmune y metabólica deprimida frente a la aparición de un estrés agudo continuado.

La puesta a punto de nuevos marcadores de estrés en esta especie, como son los receptores de glucocorticoides y los receptores de eicosanoides, ha permitido contar con una herramienta que valida los procesos de aclimatación en diferentes condiciones. Los receptores de glucocorticoides podrían ser indicadores de aclimatación, ya que su pauta de expresión en los distintos tejidos permite discriminar cuándo y cómo se están activando determinados procesos fisiológicos y sus implicaciones metabólicas. Además, se ha determinado la posibilidad de realizar variaciones en la dieta acordes con las demandas del

mercado, como la utilización de ingredientes alternativos al aceite de pescado y/o la utilización de atractantes, sin alterar la capacidad de aclimatación.

Se han identificado secuencias relacionadas con la ruta del complemento tal como los factores c1qlike, C1q 23Kd-like, c1r , c1s , C2, C3, C4-1, C4-2, C5, C6, C7-1, C7-2, C8 gamma, C8 alfa, C9, Properdin, factor D/, Factor H. Además, se han identificado varios receptores tipo Toll como el TLR1, TLR2, TLR3, TLR5S, TLR8a1, TLR8a2, TLR8B, TLR9, TLR14, TLR21. Se han identificado las interleucinas 1B, Interleucina1B-like, Interleucina 2, Interleucina 6, Interleucina 8 type I, Interleucina 8 type II, Interleucina 8 type III, Interleucina 8 type IV, Interleucina 10, Interleucina 11a, Interleucina 11b, Interleucina 12, Interleucina 15, Interleucina 15-like, Interleucina 16, Interleucina 17C, Interleucina 17N, Interleucina 18, Interleucina 22 y sus receptores Interleucina 1 receptor type 1 (ST2L), Interleucina 1 receptor type IIa, Interleucina 5 receptor alfa, Interleucina 6 Receptor alfa, Interleucina 8 receptor CXCR1, Interleucina 8 receptor CXCR2, Interleucina 10 receptor beta chain/CRFB4, Interleucina 12 receptor beta, Interleucina 15 receptor alfa 1, Interleucina 17 receptor A, Interleucina 17 receptor alfa chain, Interleucina 20 receptor alfa. Las citoquinas y quimiocinas identificadas fueron second macrophage colony-stimulating factor, Macrophage migration inhibitory factor, Macrophage migration inhibitory factor-like, monocyte-to-macrophage differentiation factor 2, LPS-binding protein/bactericidal permeability-increasing protein, C-C motif chemokine 19, C-C motif chemokine 25, chemokine CXC10-like , C-X-C motif chemokine 14, C-X-C motif chemokine 13, C-C motif chemokine 20. Los factores antivirales identificados fueron la proteína Mx, Interferon C, factores reguladores de interferón (IRF) IRF1, IRF2, IRF3, IRF4a, IRF5, IRF7, IRF8, IRF9, IRF10. Además se identificaron varias lisozimas (g-type lysozyme 1, g-type lysozyme 2, g-type lysozyme 3, c-type lysozyme 1, c-type lysozyme2) y antígenos de diferenciación (CD9 antigen, CD48, CD40).

La lisozima g y el complemento pueden representar el inicio del desarrollo del sistema inmune innato del lenguado, actividad que se inicia ya al comienzo de la metamorfosis, pudiendo reflejar la edad más temprana de adquisición de inmunocompetencia. En lenguados cultivados de manera intensiva, la expresión de lisozima g, hepcidina y complemento se reducen entre 2,3, 3 y 4,7 veces, respectivamente, en comparación al sistema intensivo. Se ha puesto de manifiesto por lo tanto el efecto negativo de las condiciones de cultivo sobre algunos genes del sistema inmune innato. Esto, unido a los efectos de corticoides y de la dexametasona, avalan la necesidad de una mejora de las condiciones de producción, prestando especial atención al mantenimiento de unos niveles adecuados de expresión de los genes que representan una primera barrera frente al ataque de patógenos.

La exposición de larvas de lenguado durante su metamorfosis a una temperatura del agua de 16°C no afecta al tamaño de los alevines obtenidos al final del proceso de su producción en criadero, respecto a una temperatura de 20°C. Si embargo, la proporción de sexos bajo esta última temperatura deriva en poblaciones de lenguado con un 62% de machos, mientras que cuando la

temperatura para la metamorfosis se reduce a 16°C, la proporción de machos pasa a ser del 46%.

2.5. CONCLUSIONES/APLICABILIDAD DE LOS RESULTADOS DEL PLAN.

Un amplio espectro de dosis de hCG producen efecto estimulador de determinados parámetros reproductivos. Una dosis de 1.000 iu/kg induce elevaciones significativas de los niveles de andrógenos, mientras que dosis de 500 y 1.000 iu/kg, pero no de 250 iu/kg, estimulan de forma similar la producción de esperma (volumen), manteniendo invariables los parámetros de densidad y movilidad. Todas las dosis hCG aplicadas sobre los machos tienen el efecto de estimular la puesta de huevos en las hembras de la población. Se recomiendan dosis de hCG de 500 iu/kg para el tratamiento de machos F1, para estimular espermiación. Dosis de GnRH α de 5, 15 y 45 μ g/kg inducen la secreción de esteroides sexuales y la ovulación en hembras F1.

La aplicación de implantes para el tratamiento de reproductores F1 en fase de gametogénesis estimula la maduración oocitaria y ovulación en hembras, pero no produce un efecto significativo sobre la producción de esperma en machos y lo que es más importante, no consigue promover la obtención de puestas fecundadas.

Se intuye la existencia de un ritmo endógeno de reproducción en el lenguado, que persiste en ausencia de la señal lumínica de fluctuación anual del fotoperíodo y sugiere un papel predominante de la temperatura del agua en la regulación de la puesta de huevos en esta especie.

Se ha detectado que el problema reproductivo del lenguado senegalés (*Solea senegalensis*) criado en cautividad (F1) es que no completan el comportamiento reproductivo. Esta disfunción de comportamiento reproductivo está particularmente centrada en los machos. El nivel de ARA dietético afecta la composición nutricional y la fisiología reproductiva de los lenguados de cultivo.

Desarrollo de un protocolo de inducción hormonal mediante inyección, para hembras de cultivo en estado de madurez gonadal avanzado (E3), que permite la obtención de huevos para realizar la fecundación artificial. Utilidad de los implantes para inducir la maduración gonadal de hembras de cultivo. Importancia del comportamiento sexual en esta especie, ha mostrado que en poblaciones mixtas salvajes-F1, hay fecundación con machos salvajes. Importancia del tipo de alimentación de la F1 en la calidad de los gametos y fecundación artificial.

Se sugiere el uso de sistemas de recirculación de agua para el engorde del lenguado. La estabilidad en la calidad del agua y la temperatura constante, son los dos factores más importantes para optimizar el rendimiento de las instalaciones del cultivo de lenguado, sin embargo no parece ocurrir lo mismo con el mantenimiento de reproductores.

La aplicación de pulsos de 15 días del probiótico Pdp11 fresco en el preengorde y engorde de lenguado senegalés en condiciones industriales es aconsejable. Es preciso optimizar la técnica de incorporación del probiótico al pienso y conocer en mayor profundidad la interacción Pdp11-huésped, así como el efecto del probiótico a nivel de la expresión de genes relacionados con la respuesta inmune.

Se dispone pues de una herramienta más que complementa las herramientas determinadas para poder ahondar en el entendimiento de la capacidad de respuesta a condiciones estresantes de esta especie y su éxito en la adaptación a variaciones ambientales y nutricionales. Se abre la posibilidad de utilización de ingredientes alternativos al aceite de pescado sin que se altere la capacidad de aclimatación de esta especie.

Disponibilidad de una base de datos con amplia lista de secuencias de genes relacionados con el sistema inmune del lenguado (<http://www.juntadeandalucia.es/agriculturaypesca/ifapa/aquagenet/soleaDB>).

El desarrollo del sistema inmune innato del lenguado se inicia durante su metamorfosis, periodo en el que genes básicos como la lisozima g y la fracción C3 del complemento experimentan una evolución muy notable. La exposición del lenguado a situaciones de estrés crónico se refleja en una disminución de la actividad de genes importantes vinculados con la inmunidad innata como el que regula la producción de la hepcidina.

Nuevos procedimientos sencillos de manipulación de la temperatura durante la etapa de desarrollo larvario del lenguado pueden ser aplicados para aumentar la proporción de hembras en los ejemplares cultivados y acceder a condiciones poblacionales más productivas.

2.6. VALORACIÓN

Los estudios de lenguado senegalés son de alta importancia dada la susceptibilidad de esta especie, de elevado valor comercial, tiene para aclimatarse a cambios ambientales y nutricionales, propios de las condiciones de producción industrial. El haber contado con un equipo de investigadores tan diverso y comprometido con el trabajo, ha representado un enriquecimiento muy significativo de cara a la diversidad de resultados obtenidos, todos con el eje común de avanzar y consolidar el cultivo del lenguado en el país. La interacción entre los grupos de trabajo del presente proyecto ha sido muy alta, pero la gestión administrativa ha sido muy dificultosa, especialmente en el último año. Dadas las dificultades económicas que ha atravesado el proyecto algunos objetivos no han sido abordados ó lo han sido parcialmente. No obstante, y aparte del recorte presupuestario experimentado al inicio del proyecto, se aprecia un sentimiento de satisfacción y agradecimiento a JACUMAR por el apoyo recibido a lo largo de todo este tiempo.

2.7. DIFUSIÓN

Los resultados de este proyecto se han divulgado mediante publicaciones científicas en revistas del SCI, la presentación de comunicaciones orales en congresos de ámbito estatal (Congreso Nacional de Acuicultura) y europeo (Aquaculture Europe), seminarios específicos (5th Workshop on the Cultivation of Soles), conferencias impartidas por los científicos del equipo investigador. Por otro lado, se han generado nuevas entradas en el Genbank y se ha generado base de datos con amplia lista de secuencias de genes relacionados con el sistema inmune del lenguado, alojada en el portal (<http://www.juntadeandalucia.es/agriculturaypesca/ifapa/aquagenet/soleaDB>).

2.8. INCIDENCIAS DE DESARROLLO

La principal incidencia que afectó de manera global al proyecto estuvo relacionada con los recortes presupuestarios. De manera más particular, y afectando de forma diferente a cada Comunidad Autónoma, se relatan atrasos en la disponibilidad de los presupuestos anuales por parte de los investigadores, situación que también afectó al desarrollo de los trabajos. El caso más llamativo ha sido el retraso en la transferencia de fondos de la Generalitat Valenciana (GV) al Centro Investigador (IATS-CSIC), de manera que, a la fecha de redacción de este informe, el equipo investigador todavía no ha recibido los fondos inicialmente asignados en el proyecto. Los detalles específicos sobre el largo proceso administrativo que se ha producido en Valencia están descritos en el informe correspondiente a esta CA. Los gastos derivados de esta investigación se han podido subsanar con adelantos de otras partidas presupuestarias disponibles para el equipo investigador del IATS de Torrelasal y serán repuestas a mediada que se inicie la transferencia de fondos de la GV.

En algunos casos, se describe por los participantes de Galicia y Cantabria alguna dificultad para la compra de material fungible durante el segundo año, debido a retrasos administrativos. Estas compras se efectuaron en el último año, pero al no constar en el convenio de colaboración entre la CA y el IEO, no fue posible recibir el ingreso del importe que había sido adelantado por el IEO.

En el caso de la CA de Canarias se describen retrasos en la disponibilidad presupuestaria en 2011 hasta Agosto de 2011, por lo que no se pudieron realizar todas las tareas previstas. Se produjo un cambio de centro de ejecución del proyecto, pasando el proyecto a la Universidad de Las Palmas de Gran Canaria para poder solventar problemas administrativos surgidos entre el Instituto Canario de Ciencias Marinas, centro inicial de ejecución del proyecto, y la Fundación Universitaria de Las Palmas, institución de gestión económico-administrativa, problemas absolutamente ajenos al personal científico-técnico de este proyecto.

INFORME FINAL EXTENSO

1.- DATOS ADMINISTRATIVOS

TÍTULO: Bases para el control de la reproducción conocimiento del sistema de defensas naturales en el lenguado (*Solea senegalensis*)

FECHAS DE REALIZACIÓN

Inicio actividades científico-técnicas: 1 enero 2009

Final de actividades científico-técnicas: 31 diciembre 2011

DATOS DEL COORDINADOR DEL PROYECTO

Nombre y Apellidos: José Pedro Cañavate Hors

Organismo/ Centro: IFAPA Centro El Toruño

Departamento: Junta de Andalucía

Teléfono: 956011312

Fax: 956011324

Correo electrónico: josep.canavate@juntadeandalucia.es

Dirección postal completa: Apartado 16. 11500 Puerto de Santa María. Cádiz.

PARTICIPANTES por cada Comunidad Autónoma

COMUNIDAD AUTÓNOMA DE ANDALUCÍA

CENTROS DE INVESTIGACIÓN

Tipo de centro: Organismo Público de Investigación

Nombre: Instituto de Investigación y Formación Agraria y Pesquera (IFAPA)

CIF: Q-4100689A

Nombre Representante Legal: Alberto Sánchez Martínez.

DATOS DE LOS INVESTIGADORES

Apellidos: Cañavate Hors

Nombre: José Pedro

Organismo: Instituto de Investigación y Formación Agraria y Pesquera.

Centro: El Toruño

Teléfono: 956011312

Fax.: 956011324

Correo electrónico: josep.canavate@juntadeandalucia.es

Dirección Postal: Apartado 16. 11500 Puerto de Santa María. Cádiz.

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

Apellidos: Fernández Díaz
Nombre: Catalina
Organismo: Instituto de Investigación y Formación Agraria y Pesquera.
Centro: El Toruño
Teléfono: 956011308
Fax.: 956011324
Correo electrónico: catalina.fernandez.diaz@juntadeandalucia.es
Dirección Postal: Apartado 16. 11500 Puerto de Santa María. Cádiz.

Apellidos: Anguis Climent
Nombre: Victoria
Organismo: Instituto de Investigación y Formación Agraria y Pesquera.
Centro: El Toruño
Teléfono: 956011335
Fax.: 956011324
Correo electrónico: mariav.anguis@juntadeandalucia.es
Dirección Postal: Apartado 16. 11500 Puerto de Santa María. Cádiz.

COMUNIDAD AUTÓNOMA DE CANARIAS

CENTROS DE INVESTIGACIÓN

Tipo de centro: centro de investigación + Universidad
Nombre: Instituto Canario de Ciencias Marinas + Universidad de Las Palmas de Gran Canaria
CIF: S3511001D / Q3518001G
Nombre Representante Legal: Juan Ruiz Arzola / José Regidor (rector)

DATOS DE LOS INVESTIGADORES

Apellidos: Montero Vítores
Nombre: Daniel
Organismo: Universidad de Las Palmas de Gran Canaria
Centro: Instituto Universitario de Sanidad Animal (IUSA)
Teléfono: 928 459 736
Fax: 928 132 908
Correo electrónico: dmontero@dbio.ulpgc.es
Dirección Postal: Trasmontaña s/n. 35416. Arucas, Las Palmas

Apellidos: Fernández-Palacios Barber
Nombre: Hipólito
Organismo: Gobierno de Canarias
Centro: Instituto Canario de Ciencias Marinas
Teléfono: 928 132 900
Fax: 928 132 908
Correo electrónico: pipo@iccm.rcanaria.es
Dirección Postal: muelle de Taliarte s/n. 35200. Telde, Las Palmas

Apellidos: Caballero Cansino
Nombre: María José
Organismo: Universidad de Las Palmas de Gran Canaria
Centro: Instituto Universitario de Sanidad Animal (IUSA)
Teléfono: 928 459 736
Fax: 928 132 908
Correo electrónico: mcaballero@dmor.ulpgc.es
Dirección Postal: Trasmontaña s/n. 35416. Arucas, Las Palmas

Apellidos: Robaina Robaina
Nombre: Lidia
Organismo: Universidad de Las Palmas de Gran Canaria
Centro: Instituto Universitario de Sanidad Animal (IUSA)
Teléfono: 928 459 736
Fax: 928 132 908
Correo electrónico: lidiar@iccm.rcanaria.es
Dirección Postal: Trasmontaña s/n. 35416. Arucas, Las Palmas

Apellidos: Roo Filgueira
Nombre: Javier
Organismo: Gobierno de Canarias
Centro: Instituto Canario de Ciencias Marinas
Teléfono: 928 132 900
Fax: 928 132 908
Correo electrónico: jroo@iccm.rcanaria.es
Dirección Postal: muelle de Taliarte s/n. 35200. Telde, Las Palmas

Apellidos: Socorro Cruz
Nombre: Juan
Organismo: Gobierno de Canarias
Centro: Instituto Canario de Ciencias Marinas
Teléfono: 928 132 900
Fax: 928 132 908
Correo electrónico: juansocorro@ono.com
Dirección Postal: muelle de Taliarte s/n. 35200. Telde, Las Palmas

Apellidos: Hernández Cruz
Nombre: Carmen Mari

Organismo: Universidad de Las Palmas de Gran Canaria
Centro: Instituto Universitario de Sanidad Animal (IUSA)
Teléfono: 928 459 736
Fax: 928 132 908
Correo electrónico: chernandez@dbio.ulpgc.es
Dirección Postal: Trasmontaña s/n. 35416. Arucas, Las Palmas

Apellidos: Benítez Dorta
Nombre: Vanessa
Organismo: Universidad de Las Palmas de Gran Canaria
Centro: Instituto Universitario de Sanidad Animal (IUSA)
Teléfono: 928 459 736
Fax: 928 132 908
Correo electrónico: vavene@hotmail.com
Dirección Postal: Trasmontaña s/n. 35416. Arucas, Las Palmas

COMUNIDAD AUTÓNOMA DE CANTABRIA

CENTROS DE INVESTIGACIÓN

Tipo de centro: Organismo Público de Investigación
Nombre: Instituto Español de Oceanografía
CIF: Q-2823001-I
Nombre Representante Legal: Eduardo Balguerías Guerra

Tipo de centro: Laboratorio Autónomo
Nombre: Servicio Laboratorio y Control
CIF: S3933002B
Nombre Representante Legal: M^a Carmen Fernández Ruiz

Tipo de centro: Universidad
Nombre: Universidad de Málaga
CIF: Q2918001E
Nombre Representante Legal: Adelaida de la Calle

Tipo de centro: Universidad
Nombre: Universidad de Cantabria
CIF: Q3918001C
Nombre Representante Legal: José Carlos Gómez Sal

Tipo de centro: Universidad
Nombre: Universidad de Cádiz
CIF: Q1132001G
Nombre Representante Legal: Eduardo González Mazo

Tipo de centro: Hospital
Nombre: Hospital Universitario Marqués de Valdecilla

CIF: Q3900760D

Nombre Representante Legal: César Pascual Fernández

DATOS DE LOS INVESTIGADORES

Apellidos: Chereguini Fernandez-Maqueira

Nombre: M^a del Olvido

Organismo: Instituto Español de Oceanografía

Centro: Centro Oceanográfico de Santander

Departamento: Cultivos marinos

Teléfono:942321513

Fax.:942323486

Correo electrónico: o.chereguini@st.ieo.es

Dirección Postal: B^o La Corbanera s/n CP39012 Monte- Santander

Apellidos: García de la Banda García

Nombre: Inés

Organismo: Instituto Español de Oceanografía

Centro: Centro Costero Santander

Teléfono:942321513

Fax.:942323486

Correo electrónico: ines.gbanda@st.ieo.es

Dirección Postal: Planta de Cultivos "El Bocal" B^o Corbanera s/n Monte C.P. 39012 Santander

Apellidos: Rasines Pérez

Nombre: Inmaculada

Organismo: Instituto Español de Oceanografía

Centro: Centro Oceanográfico de Santander

Departamento: Cultivos marinos

Teléfono:942321513

Fax.:942323486

Correo electrónico: inma.rasines@st.ieo.es

Dirección Postal: B^o La Corbanera s/n CP39012 Monte- Santander.

Apellidos: Fernández Ruiz

Nombre: M^a Carmen

Organismo: Consejería Ganadería Agricultura y Pesca (Dirección General Ganadería)

Centro: Servicio Laboratorio y Control

Teléfono : 942332400

Fax.: 942332400

Correo electrónico: fernandez_ma@cantabria.es

Dirección Postal:.39011

Apellidos: Sola Izcue

Nombre: M^a Esperanza

Organismo: Consejería Ganadería Agricultura y Pesca (Dirección General Ganadería)

Centro: Servicio Laboratorio y Control

Departamento: Área patología animal

Teléfono : 942332400

Fax.:942332400

Correo electrónico: sola_e@cantabria.es

Dirección Postal: 39011

Apellidos: Moriñigo Gutiérrez

Nombre: Miguel Angel

Organismo: Universidad de Málaga

Centro: Facultad Ciencias Dep. Microbiología

Teléfono:952131862

Fax.:952131889

Correo electrónico: morinigo@uma.es

Dirección Postal: Facultad Ciencias Campus Teatinos s/n C.P.29071

Málaga

Apellidos: Arijo Andrade

Nombre: Salvador

Organismo: Universidad de Málaga

Centro: Facultad Ciencias Dep. Microbiología

Teléfono:952131862

Fax.:952131889

Correo electrónico: morinigo@uma.es

Dirección Postal: Facultad Ciencias Campus Teatinos s/n C.P.29071

Málaga

Apellidos: Mancera

Nombre: Juan Miguel

Organismo: Universidad de Cádiz

Centro: Facultad de Ciencias del Mar y Ambientales

Departamento de Biología

Teléfono:956016014

Fax.:956016019

Correo electrónico: juanmiguel.mancera@uca.es

Dirección Postal: Facultad de Ciencias del Mar y Ambientales

Puerto Real C.P.11510 Cádiz

Apellidos: Canteras Jordana

Nombre: Juan Carlos

Organismo: Universidad Cantabria

Centro: Escuela Técnica Superior de Ingeniería de Caminos Canales y Puertos

Departamento: Ecología

Teléfono:942201805

Fax.:942201703

Correo electrónico: canteraj@unican.es
Dirección Postal: Avenida de los Castros s/n C.P.39005 Santander

Apellidos: Moreno-Ventas Bravo
Nombre: Xabier
Organismo: Universidad Cantabria
Centro: Escuela Técnica Superior de Ingeniería de Caminos Canales y Puertos
Departamento: Ecología
Teléfono:942202297
Fax.:942201703
Correo electrónico: morenox@unican.es
Dirección Postal: Avenida de los Castros s/n C.P.39005 Santander

Apellidos: Arce Mateos
Nombre: Félix
Organismo: Hospital Universitario Marqués de Valdecilla
Departamento: Anatomía Patológica
Teléfono:942362299
Fax.:942203492
Correo electrónico: farce@humv.es
Dirección Postal: Anatomía Patológica Hospital Avenida de Valdecilla s/n C.P.39008 Santander

COMUNIDAD AUTÓNOMA DE CATALUÑA

CENTROS DE INVESTIGACIÓN

Tipo de Centro: Empresa Pública de I + D
Nombre: IRTA (Institut de Recerca i Tecnologia Agroalimentaries)
CIF: Q-5855049-B
Nombre Representante Legal: Agustí Fonts Cabestany

DATOS DE LOS INVESTIGADORES

Apellidos: Duncan
Nombre: Neil
Organismo: IRTA Sant Carles de la Rapita
Departamento: Unidad de Cultivos Acuáticos
Teléfono: 977 745427 ex 1815
Fax.: 977 744138
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: IRTA Sant Carles de la Rapita

Departamento: Unidad de Cultivos Acuáticos
Teléfono: 977 745427
Fax.: 977 744138
Correo electrónico: ana.roque@irta.es
Dirección postal: Ctra. Poble Nou Km 6, 43540. San Carlos de la Rápita, Tarragona

Apellidos: Furones Nozal
Nombre: Dolores
Organismo: IRTA (Institut de Recerca i Tecnologia Agroalimentaries)
Teléfono: 977 745427
Fax.: 977 744138
Correo electrónico: dolors.furones@irta.es
Dirección postal: Ctra. Poble Nou Km 6, 43540. San Carlos de la Rápita, Tarragona

Apellidos: Andree
Nombre: Karl Blyth
Organismo: IRTA (Institut de Recerca i Tecnologia Agroalimentaries)
Departamento: Unidad de Cultivos Acuáticos
Teléfono: 977 745427
Fax.: 977 744138
Correo electrónico:
Dirección postal: Ctra. Poble Nou Km 6, 43540. San Carlos de la Rápita, Tarragona

Apellidos: Carazo Ortega
Nombre: Ignacio
D.N.I.: 12770369
Organismo: IRTA (Institut de Recerca i Tecnologia Agroalimentaries)
Departamento: Unidad de Cultivos Acuáticos
Teléfono: 977 745427
Fax.: 977 744138
Correo electrónico:
Dirección postal: Ctra. Poble Nou Km 6, 43540. San Carlos de la Rápita, Tarragona

Apellidos: Norambuena Filcun
Nombre: Fernando
D.N.I.: X8794302-E
Organismo: IRTA (Institut de Recerca i Tecnologia Agroalimentaries)
Departamento: Unidad de Cultivos Acuáticos
Teléfono: 977 745427
Fax.: 977 744138
Correo electrónico:
Dirección postal: Ctra. Poble Nou Km 6, 43540. San Carlos de la Rápita, Tarragona

COMUNIDAD AUTÓNOMA DE GALICIA

CENTROS DE INVESTIGACIÓN

Tipo de centro: Organismo Público de Investigación
Nombre: Instituto Español de Oceanografía
CIF: Q-2823001-I
Nombre Representante Legal: Eduardo Balguerías Guerra

Tipo de centro: Centros Públicos de Investigación de la CA de Galicia
Nombre: Centro de Investigaciones Mariñas (CIMA)
CIF: S-1511001-H
Nombre Representante Legal: Susana Rodríguez Carballo

Tipo de centro: Centros Públicos de Enseñanza de la CA de Galicia
Nombre: Instituto Galego de Formación en Acuicultura (IGaFA)
CIF: S-1511001-H
Nombre Representante Legal: Susana Rodríguez Carballo

DATOS DE LOS INVESTIGADORES

Apellidos: Peleteiro Alonso
Nombre: José Benito
Organismo: Instituto Español de Oceanografía
Centro: Centro Oceanográfico de Vigo
Departamento: Acuicultura
Teléfono: +34 986 462 929
Fax.: +34 986 498 626
Correo electrónico: tito.peleteiro@vi.ieo.es
Dirección Postal: Subida a Radio Faro nº50. 36390 Vigo

Apellidos: Cal Rodríguez
Nombre: Rosa María
Organismo: Instituto Español de Oceanografía
Centro: Centro Oceanográfico de Vigo
Departamento: Acuicultura
Teléfono: +34 986 462 929
Fax.: +34 986 498 626
Correo electrónico: rosa.cal@vi.ieo.es
Dirección Postal: Subida a radio Faro nº50. 36390 Vigo

Apellidos: Álvarez-Blázquez Fernández
Nombre: Blanca
Organismo: Instituto Español de Oceanografía
Centro: Centro Oceanográfico de Vigo
Departamento: Acuicultura
Teléfono: +34 986 462 929

Fax.: +34 986 498 626
Correo electrónico: blanca.alvarez@vi.ieo.es
Dirección Postal: Subida a radio Faro nº50. 36390 Vigo

Apellidos: Perez Rodriguez
Nombre: Monserrat
Organismo: Instituto Español de Oceanografía
Centro: Centro Oceanográfico de Vigo
Departamento: Acuicultura
Teléfono: +34 986 462 929
Fax.: +34 986 498 626
Correo electrónico: montse.perez@vi.ieo.es
Dirección Postal: Subida a radio Faro nº50. 36390 Vigo

Apellidos: Linares Cuerpo
Nombre: Fátima
Organismo: Consellería de Medio Rural e Mariño
Centro: Centro de Investigacións Mariñas (CIMA)
Departamento: Acuicultura
Teléfono: +34 886 206364
Fax.: +34 886 206372
Correo electrónico: flinares@cimacoron.org
Dirección Postal: Pedras de Corón s/n. Apto 13, Vila Nova de Arousa 76620 Pontevedra.

Apellidos: Rodriguez Villanueva
Nombre: José Luis
Organismo: Consellería de Medio Rural e Mariño
Centro: Instituto Galego de Formación en Acuicultura (IGaFA)
Departamento: Acuicultura
Teléfono: +34 986 527101
Fax.: +34 986 527161
Correo electrónico: copirv@ya.com
Dirección Postal: Niño do Corvo s/n. Illa de Arousa. 36626 Pontevedra

COMUNIDAD AUTÓNOMA DE VALENCIA

CENTROS DE INVESTIGACIÓN

Tipo de centro: Centro público de I+D
Nombre: Instituto de Acuicultura de Torre la Sal (IATS-CSIC)
CIF: Q-2818002-D
Nombre Representante Legal: Juan Carlos Navarro Tárrega (Director)

DATOS DE LOS INVESTIGADORES

Apellidos: Mañanós Sánchez

Nombre: Evaristo Luís
Organismo: Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC).
Centro: Instituto de Acuicultura de Torre la Sal (IATS-CSIC, Castellón)
Departamento: Fisiología de Peces y Biotecnología
Teléfono: 964-319500
Fax: 964-319509
Correo electrónico: evaristo@iats.csic.es
Dirección postal completa: Instituto de Acuicultura de Torre la Sal, Torre la Sal s/n, 12595-Ribera de Cabanes, Castellón

Apellidos: Ramos Jara
Nombre: Jesús
Organismo: Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC).
Centro: Instituto de Acuicultura de Torre la Sal (IATS-CSIC, Castellón)
Teléfono: 964-319500
Fax: 964-319509
Correo electrónico: ramos@iats.csic.es
Dirección postal completa: Instituto de Acuicultura de Torre la Sal, Torre la Sal s/n, 12595-Ribera de Cabanes, Castellón

Apellidos: Bayarri Clariana
Nombre: María José.
Organismo: Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC).
Centro: Instituto de Acuicultura de Torre la Sal (IATS-CSIC, Castellón)
Teléfono: 964-319500.
Fax: 964-319509.
Correo electrónico: mbayarri@iats.csic.es
Dirección postal completa: Instituto de Acuicultura de Torre la Sal, Torre la Sal s/n, 12595-Ribera de Cabanes, Castellón

Apellidos: Piquer Zorrilla
Nombre: Vanesa.
Organismo: Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC).
Centro: Instituto de Acuicultura de Torre la Sal (IATS-CSIC, Castellón)
Teléfono: 964-319500
Fax: 964-319509
Correo electrónico: vanesa@iats.csic.es

2.- RESULTADOS TECNICOS DEL PLAN NACIONAL

2.1. OBJETIVOS INICIALES

A. Conseguir reproducción controlada en cautividad con ejemplares de lenguado procedentes de cultivo

A.1. Búsqueda de terapias hormonales para facilitar ovulación, espermiación y desove natural.

A.2. Desarrollar técnicas para conseguir la reproducción artificial.

A.3. Establecer fuentes de variabilidad que afectan a la reproducción de ejemplares de cultivo.

B. Determinar condiciones de cultivo para una óptima respuesta inmune y resistencia a patógenos en juveniles.

B.1. Establecer niveles de referencia para evaluar la respuesta inmune.

B.2. Evaluar las modificaciones de la respuesta inmune por las condiciones de manejo en cultivo.

B.3. Conseguir protocolos eficaces de prevención de enfermedades.

2.2. OBJETIVOS REALIZADOS

De acuerdo al objetivo inicial A1 se han cumplido los siguientes objetivos:

1. Conocer los efectos de tratamientos hormonales prolongados sobre el desarrollo gonadal y maduración en reproductores F1.

2. Desarrollar un método para una eficaz administración de terapias hormonales, incluyendo la aplicación de implantes de GnRHa para inducir la maduración gonadal.

3. Determinación del tiempo de ovulación de hembras F1 que reciben tratamiento hormonal con GnRHa (periodo de latencia) y de la viabilidad o calidad de los ovocitos retenidos en la cavidad ovárica después de la ovulación.

4. Establecer la dosis óptima de hCG (gonadotropina coriónica humana) para las terapias hormonales de estimulación de la espermiación en machos de lenguado.

De acuerdo al objetivo inicial A2 se han cumplido los siguientes objetivos:

1. Confirmación del protocolo de inducción hormonal y fecundación artificial de lenguado cultivado del IEO, comprobando la importancia de la hora del tratamiento.

2. Comparación de la calidad del esperma crioconservado de machos F1 *versus* salvajes para la fecundación artificial.

De acuerdo al objetivo inicial A3, se han cumplido los siguientes objetivos:

1. Determinar los aspectos del comportamiento sexual del lenguado cultivado.
2. Conocer la influencia de la alimentación sobre la reproducción de ejemplares F1 a nivel de esteroides en sangre y de la calidad del esperma en los machos F1.
3. Conocer la influencia de la alimentación de ejemplares F1 sobre la calidad de los gametos para realizar fecundación artificial.
4. Asociar efecto de la temperatura del agua durante el desarrollo temprano del lenguado con la proporción de sexos de sus poblaciones en cultivo.

De acuerdo al objetivo inicial B1, se han cumplido los siguientes objetivos:

1. Describir el inicio de la actividad durante el desarrollo larvario de los principales genes implicados en la adquisición del sistema inmune en el lenguado.
2. Identificación de indicadores de estrés en larvas de *Solea senegalensis*.
3. Creación de genoteca de acceso público con los principales genes implicados en el sistema inmune del lenguado.

De acuerdo al objetivo inicial B2, se han cumplido los siguientes objetivos:

1. Determinar el efecto de determinados nutrientes en la respuesta a estrés de *Solea senegalensis* a través de la expresión genómica de indicadores de estrés.
2. Establecer diferencias a nivel de sistema inmune entre lenguados cultivados de manera extensiva e intensiva.

De acuerdo al objetivo inicial B3 se han cumplido los siguientes objetivos:

1. Establecer un protocolo óptimo de incorporación del probiótico Pdp11 (*Shewanella putrefaciens*) mediante dos formas de adición (fresco y liofilizado) en el preengorde ($10.5 \pm 4.5g$) del lenguado senegalés.
2. Determinar la influencia del probiótico Pdp11 sobre el estado inmune y capacidad de defensa del lenguado senegalés cultivado a baja y alta densidad, y como elemento compensador del estrés agudo.
3. Optimizar un protocolo de adición del probiótico Pdp11 bioencapsulado en alimento vivo durante la fase larvaria y destete del lenguado.

2.3. METODOLOGÍA

2.3.1. Metodología relacionada con objetivo A (Conseguir reproducción controlada en cautividad con ejemplares de lenguado procedentes de cultivo).

Como actividad básica en este sub-apartado metodológico, se llevó a cabo el cultivo de reproductores de lenguado y el seguimiento de sus puestas. Así, en el IATS de Castellón se dispuso de una nave de cultivo con tanques circulares de fibra de vidrio, de color gris oscuro, sin sustrato arenoso, de 4.000, 3.000 y 2.000 L de capacidad. Los tanques estuvieron expuestos a fotoperiodo natural todo el

año y tapados con malla para evitar exposición excesiva a la luz solar durante el día. El circuito fue abierto de agua marina, con flujo que proporciona una renovación del 20% por hora. Los tanques disponen de dos entradas de agua, una de mar (37‰ salinidad) y otra de pozo costero, que suministra agua marina filtrada naturalmente, con temperatura (18-19°C) y salinidad (5-10‰) constantes a lo largo del año. Los animales se mantuvieron bajo temperatura natural todo el año (entrada de agua de mar), excepto los meses de verano (julio-septiembre) en que ésta se atenuó a un máximo de aproximadamente 21°C mediante mezcla de aguas (mar y pozo); la salinidad durante este período se mantuvo alrededor de 15-18‰ (fig. 1). La densidad de cultivo osciló entre 3 y 5 kg/m². Se crearon 3 lotes de reproductores, 1) reproductores F1 nacidos en 2001 (8 años de edad), 2) reproductores F1 nacidos en 2006 (3 años de edad) y 3) reproductores salvajes. Los reproductores F1 de 8 años provienen de puestas del IFAPA “El Toruño” (Cádiz) y se transportaron al IATS con 2 años de edad; en el proyecto estos reproductores se utilizan para el seguimiento de tasas de crecimiento y estudio de puestas naturales. Los reproductores F1 de 3 años provienen de puestas del IEO de Santander y se transportaron al IATS con 2 años de edad; estos reproductores se utilizan básicamente para las experimentaciones in vivo. El lote de reproductores salvajes se ha ido formando a lo largo del proyecto en colaboración con el IRTA, que realizó la cuarentena y aclimatación de lenguados pescados en la bahía de Sant Carles de la Rápita y que fueron transportados posteriormente al IATS. La alimentación de los reproductores salvajes y F1 de 8 años es natural, basada en mejillón (dos días por semana), calamar (2 días por semana) y gusano poliqueto *Nereis virens* (1 día por semana). Los reproductores F1 de 3 años se alimentan con pienso comercial (Élite-Skretting, 5-7 mm de diámetro de gránulo), suministrado por alimentador automático de cinta, 5 días por semana. Todos los reproductores se identificaron individualmente con chips electrónicos (pit-taq, AVID) y se determinó el sexo por inmunoensayo, mediante análisis plasmático de la proteína vitelogenina (VTG) específica de hembras.

Los stocks de reproductores de lenguado estabulados en el IEO de Vigo consistieron en un primer grupo de ejemplares salvajes y otro F-1 nacido en el criadero. El stock salvaje estuvo formado por ejemplares autóctonos, y junto con los F1, se redistribuyeron en siete grupos de reproductores, haciendo todas las combinaciones posibles, teniendo en cuenta el origen y el sexo, de manera que las posibilidades de cruzamientos incluyeran todas las opciones. Este sistema de cultivo, se llevó a cabo en circuito abierto de agua y con alimentación a base de pienso semihúmedo. Por otro lado, en el IGaFA (Instituto Galego de Formación en Acuicultura de la Xunta de Galicia), se utilizaron individuos F-1 mantenidos en circuito cerrado con recirculación de agua y alimentados con pienso seco comercial. Todos los grupos experimentales de lenguado fueron sometidos a control de termoperíodo en diente de sierra para inducir a la madurez.

Para el registro de puestas, los tanques de reproductores cuentan con recogedores de huevos en la salida de aguas, que se controlan diariamente a primera hora de la mañana. En caso de puesta, los huevos se recogen y se dejan decantar en agua de mar (37‰ salinidad) utilizando cilindros graduados, para la separación y estimación del volumen de huevos flotantes y no flotantes.

Posteriormente, se determina el peso de la puesta de huevos flotantes y se estima el nº de huevos, mediante conteo de varias sub-muestras pre-pesadas. En general, se obtiene la siguiente relación: 1 ml = 1 g = 1.500 huevos. Los huevos se incuban en cubiletes suspendidos en baño de agua marina filtrada, a 16-18 °C, con aireación y en circuito cerrado. Se determina la tasa de eclosión de cada puesta, a los 2-3 días post-puesta. En caso de eclosión, las larvas se cuentan y se transfieren a tanques de incubación larvaria, para determinar tasas de supervivencia. Para cultivo larvario se dispone de una batería de tanques circulares de fibra de vidrio de 500 L de capacidad, en circuito cerrado equipado con filtración (mecánica y biológica) y esterilización UV de agua y control de temperatura. Durante todo el proyecto, el muestreo y manipulación de peces se hace sobre animales anestesiados (inmersión en 0,1% fenoxietanol) y según las normas establecidas por el Comité de Bioética del IATS-CSIC.

En el estudio sobre la inducción hormonal en machos de lenguado se determinó la dosis óptima de hCG (gonadotrofina corionica humana, Pharma-Lepori, Barcelona) para estimular su espermiación. Se utilizaron reproductores F1 de 4 años de edad y peso corporal de 773±36 g en machos y 925±47 g en hembras, distribuidos en 4 tanques (8 machos y 9 hembras por tanque). Las hembras de cada grupo no se manipularon durante el experimento, mientras que los machos fueron sometidos a los siguientes tratamientos: solución salina (control) o hCG a 250, 500 y 1.000 iu/kg. Los tratamientos se aplicaron por inyección intramuscular (4 inyecciones), administradas semanalmente. El experimento comenzó el 8 de abril 2010 (día 0) y duró 28 días. Se tomaron muestras de sangre a días 0-14-28 y de esperma a día 28. La sangre se centrifugó (3.000 g, 15 min, 4°C) para la separación del plasma, que se alicuotó y congeló a -20°C para el análisis de esteroides sexuales por ELISA, incluyendo testosterona (T), 11-ketotestosterona (11KT) y esteroide inductor de la maduración (MIS, 17-20 βP) (T y 11KT). Las muestras de esperma se recogieron con jeringa, mediante presión suave en la zona de los testículos y se mantuvo en hielo hasta la determinación de parámetros espermáticos (volumen, densidad y movilidad). La movilidad espermática se determinó al microscopio, tras activación del esperma con agua de mar, a dilución 1/20. La movilidad de los espermatozoides se puntuó de 0 a 5, dependiendo del porcentaje de células de la población que mostraron movimiento de desplazamiento: 0) ningún espermatozoide móvil, 1) 0-20%, 2) 20-40%, 3) 40-60%, 4) 60-80% y 5) 80-100% de movilidad de la población. La densidad espermática se calculó utilizando cámara de Neubauer tras diluir la muestra 1/20 en una solución de formalina al 1%.

Para el estudio de inducción hormonal de madurez gonadal en hembras F1, en el IEO de Santander se estabularon 16 hembras F1 en estado de madurez E3, repartidas en tres grupos experimentales en tanques de 4 m² con una relación macho:hembra de 1:1. En el grupo control (N=4) los ejemplares recibieron una inyección intramuscular de solución salina (0.15 mL/Kg). En el grupo IN (N=6) las hembras recibieron 4 inyecciones intramusculares semanales de 25 µg de GnRHa/Kg. En el grupo IM (N=6) las hembras se trataron con un implante de 50 µg kg⁻¹GnRHa que se insertó en la musculatura dorsal mediante

una jeringa especial. Antes del tratamiento las hembras fueron anestesiadas con aceite de clavo (40 ppm) durante un minuto. Diariamente se examinaron las hembras hasta que se obtuvo la primera puesta por masaje abdominal, y posteriormente se continuó realizando masaje abdominal cada dos o tres días, según el grado de hinchazón abdominal. Las puestas se recogían en un bol seco evitando la contaminación por heces, orina o agua de mar. Se registró el nº de puestas por hembra así como el volumen de huevos obtenido en cada puesta. Se calculó el volumen total de huevos por hembra como la suma de los volúmenes de huevos de cada una de sus puestas y la fecundidad relativa como número de huevos/Kg.

Para la determinación del tiempo de ovulación en hembras inducidas hormonalmente, 10 hembras F1 en estado de maduración gonadal E3, fueron inyectadas con 25 ugr/kg de LHRHa, a las 12 a.m. La temperatura del agua se mantuvo a 16 °C todo el tiempo. A las 32 h del tratamiento hormonal se comenzó a realizar suaves presiones abdominales cada 3h hasta que se obtuvieron los primeros ovocitos, ese tiempo se consideró el tiempo de ovulación o tiempo cero. A partir de ese momento, cada 3h se obtuvieron pequeñas porciones de huevos que se fecundaron artificialmente por triplicado con el mismo pool de esperma crioconservado por hembra. La incubación de los huevos fecundados se realizó a 19 °C y la evolución temporal de la calidad de los ovocitos mantenidos en la cavidad abdominal de la hembra después de la ovulación se estimó mediante las tasas de fecundación y de eclosión. Para conocer el efecto de la hora de administración de la hormona, se procedió de manera similar, pero el tratamiento hormonal con 25 ug/kg de LHRHa se efectuó a las 6:00 horas (Grupo 6), a las 12:00 horas (Grupo 12) o a las 19:00 horas (Grupo 19). Se valoró el porcentaje de viabilidad aparente ((nº de huevos esféricos, transparentes y con las gotas de grasa repartidas uniformemente/nº huevos) x100) y con los huevos obtenidos se realizaron fecundaciones artificiales por triplicado con esperma crioconservado. Se calculó la tasa de fecundación, y tras la incubación la tasa de eclosión.

En experimentos complementarios para estudiar la inducción de la puesta de lenguados F1 con las hormonas GnRH α y PGF2 α , se estabularon en las instalaciones del IRTA en Tarragona 30 reproductores de lenguado senegalés (F1) cultivados a partir de huevos procedentes del Centro IFAPA El Toruño, en El Puerto de Santa María. Los animales fueron distribuidos en 6 tanques, circulares, de fibra de vidrio (diámetro de 1.7 m) con capacidad de 2 m³. El peso medio de los animales fue de 1413 g \pm 307 g teniendo una carga media de los tanques de 7066 g/m³ \pm 693 g. Considerando como requisito no incluir hermanos o medio-hermanos en los grupos experimentales, los reproductores fueron escogidos al azar y distribuidos 5 animales (2 hembras y 3 machos) en cada uno de los 6 tanques. Previamente al comienzo del experimento, se evaluó la madurez de los machos mediante extracción y observación del esperma. La madurez de las hembras fue evaluada a su vez mediante el Índice visual. En la salida de cada tanque se instaló un colector de huevos de superficie, por él que se filtraba toda el agua que es eliminada del tanque. Las puestas fueron recogidas cada día entre las 8-9 de la mañana. Los huevos fueron recogidos y los siguientes datos registrados: volumen total de huevos, grado de desarrollo y el porcentaje de

huevos fecundados. Cada tanque se encontraba cerrado con un toldo aislante superior para controlar el fotoperiodo. Se utilizó un fotoperiodo de 12 horas de luz mediante fluorescentes blancos de 58 W y una intensidad de 150 lux. Durante el experimento la temperatura se mantuvo constante a 18°C ($\pm 1^\circ\text{C}$). 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 (onda >720 nm pero impide el paso de las de menor longitud de onda) con la intensidad ajustada a 5 lux ± 1 lux. La recirculación se programó con un recambio de 250L h⁻¹ por tanque. La alimentación fue: 3 días a la semana pienso en raciones de 0,5% del peso corporal total y tres días de alimento fresco, un día de mejillón, otro de calamar y otro de gusano, en raciones del 0,7% del peso corporal total.

Para la inducción hormonal de la puesta, los tanques se dividieron en 2 grupos, un grupo control que constaba de 2 tanques (10 animales, 4 hembras y 6 machos) y un grupo con tratamiento, que constaba de 4 tanques (20 animales, 8 hembras y 12 machos). El día 0 del experimento, los animales de los tanques con tratamiento fueron inducidos con GnRH_a. Los animales control fueron inyectados con suero salino en las mismas dosis. Estas dosis fueron suministradas cada 3 días. Se realizaron inyecciones de PGF_{2a} en los casos en que las puestas recolectadas fueron superiores a 15 ml, las cuales se mantuvieron durante 10 días. El estudio del comportamiento se llevó a cabo entre los días 0 y 14 del experimento. El comportamiento de los peces se registro mediante cámaras subacuáticas (F60B/NIR580-50G, Praesentis, S.L., Barcelona) fijadas en dirección hacia el fondo, en la superficie central de cada tanque, de esta forma se pudo registrar la actividad de los animales en el fondo del tanque. Las imágenes (videos) fueron grabadas y almacenadas en una grabadora digital de ocho entradas (CCTV8C-Mon17 Praesentis, S.L., Barcelona). Se realizó un seguimiento cuantitativo de la actividad mediante sensores de movimiento infrarrojos, situados dentro del tanque.

Para determinar la dosis óptima de GnRH_a ([D-Ala₆, Pro₉Net]-LHRH, Bachem) para la estimulación de la maduración gonadal y ovulación en hembras de lenguado, se utilizaron reproductores F1 de 4 años de edad y peso corporal de 935 \pm 67 g en machos y 1064 \pm 56 g en hembras, distribuidos en 4 tanques (4 machos y 8 hembras por tanque). Los machos de cada grupo no se manipularon durante el experimento, mientras que las hembras fueron sometidas a los siguientes tratamientos: solución salina (control) o GnRH_a a 5, 15 y 45 ug/kg. Los tratamientos se aplicaron mediante inyección intramuscular simple (tiempo 0). Se tomaron muestras de sangre a 0-5-11-24-48 h post-tratamiento (pt), siguiendo el procedimiento descrito en el experimento anterior. El plasma se analizó mediante ELISA para VTG, E₂, T y MIS. A 48 y 72 h pt se realizó masaje abdominal para determinar la ocurrencia de ovulación y cantidad y calidad de los huevos (stripping) y en su caso, realización de fecundación artificial con esperma de machos F1.

En el estudio con implantes hormonales, se seleccionaron 12 hembras que en años anteriores no habían alcanzado el estado de maduración E₃, y se

repartieron en dos tanques con una relación macho:hembra de 1:1. Tanque Control: las hembras no recibieron tratamiento hormonal, mientras que en el otro Tanque IM: las hembras recibieron un implante de GnRHa con una dosis aproximada de 50 µgr/ Kg. La temperatura se mantuvo constante durante todo el periodo de experimentación ($T = 16\text{ }^{\circ}\text{C}$) y la alimentación fue 0,5% del peso total con la dieta comercial Vitalis Cal (Skretting). Cada 2-3 días, al principio y después cada 7 días, se revisaron todas las hembras para observar su estado de maduración. Otros tres grupos de hembras en estado de maduración E3 fueron sometidos a cuatro inyecciones de 25 µg/Kg. de LHRHa siguiendo tres tratamientos: A. inyecciones en los días 0, 7, 22 y 29; B. inyecciones en los días 0, 7, 37 y 44; C. inyecciones en los días 0, 15, 30 y 45. Se determinó el nº de hembras que responden a cada inyección, el nº de huevos por c.c, el nº de huevos totales por Kg. de hembra y el nº de huevos por Kg. de hembra y puesta. Además, para valorar la calidad de los huevos se realizaron fecundaciones artificiales FA con espermatozoides criopreservados y se determinó la tasa de fecundación.

Para conocer la efectividad de un tratamiento hormonal prolongado mediante implantes sobre la estimulación de la gametogénesis y maduración gonadal en machos y hembras de lenguado se utilizaron reproductores F1 de 5 años de edad y peso corporal de $937\pm 58\text{ g}$ en machos y $1184\pm 55\text{ g}$ en hembras. Los peces se distribuyeron en 4 tanques (6 machos y 9 hembras por tanque), para constituir 2 grupos experimentales por duplicado, que se trataron con, 1) salino (control) y 2) 3 implantes GnRHa (10 µg/kg), administrados cada 3 semanas. La disposición de tanques duplicados se hizo con el fin de disponer, para cada grupo experimental, de tanques no sometidos a muestreo y destinados únicamente al estudio de puesta de huevos en condiciones de mínimo estrés. Se tomaron muestras de sangre, biopsia ovárica y espermatozoides a día 0 y a 2 semanas después de cada administración de implante GnRHa. El plasma sanguíneo se utilizó para análisis de vitelogenina (VTG) y esteroides sexuales (E2, T, 11KT y MIS) por ELISA. El espermatozoides se utilizó para análisis de parámetros de volumen, movilidad y densidad. Biopsias ováricas se obtuvieron de las hembras mediante canulación y se observaron inmediatamente al binocular para determinar, con ayuda de ocular micrométrico, el diámetro de los oocitos. El estado de desarrollo se estimó según el porcentaje de oocitos en los diferentes rangos de talla.

La comparación del poder fecundante de espermatozoides precedentes de ejemplares salvajes W y F1 se efectuó después de criopreservar espermatozoides, formando pools de espermatozoides procedentes como mínimo de dos machos salvajes o F1. Con estos pools se fecundaron 6 puestas, cada una de ellas con un pool de espermatozoides criopreservados de machos salvajes y uno de machos F1. Las fecundaciones artificiales se realizaron por triplicado añadiendo a 1 cc huevos 30 µl de espermatozoides criopreservados (F1 ó W) y 1cc de agua de mar para activar al espermatozoides. Se determinó el porcentaje de fecundación y el de eclosión.

Para conocer la interacción entre sexos en función del origen salvaje o de cautividad de estos, en el IEO de Santander se formaron 2 stocks de reproductores, un tanque (A) con machos salvajes y hembras cultivadas F1 y F2 y otro (B), con hembras salvajes y machos cultivados F1 y F2. Los ejemplares F2

fueron obtenidos mediante fecundación artificial en el año 2007. El tanque A tenía 8 hembras y 7 machos con pesos medios de 1,16 Kg y 1,24 Kg, respectivamente, y el tanque B tenía 3 hembras y 5 machos con pesos medios de 1,75 Kg y 0,94 Kg, respectivamente. Todos los ejemplares estaban caracterizados genéticamente. A mediados de febrero 2010 se comenzó a manipular la temperatura del agua, con el patrón en diente de sierra, ya conocido. Se instalaron colectores para la recogida diaria de puestas, evaluándose su calidad atendiendo al volumen total, volumen flotante y no flotante, fecundidad relativa diaria, tasa de fecundación y eclosión. Además, se tomaron larvas de las puestas para los análisis genéticos de paternidad. Para el estudio de comportamiento se instalaron luces rojas de baja intensidad y un total de 4 cámaras conectadas a un grabador digital en el tanque donde se registraron puestas fecundadas. De manera similar, en el IEO de Vigo se crearon dos grupos de reproductores de lenguado (denominados T6 y T7), en sendos tanques de 25 m³. En el primero se estabularon 12 hembras F1, junto a machos salvajes y 4 machos F1, mientras que en el segundo fueron 12 hembras salvajes, a las que se unieron 8 machos F1 y 4 machos salvajes. El procedimiento de manipulación de temperatura y seguimiento de puestas fue similar al descrito antes.

En el estudio del efecto de la alimentación de reproductores sobre su reproducción, se estabularon durante 2009 y 2010 ejemplares F1 en dos tanques de 7 m³ (LP5 y LP6) que recibieron diferente alimentación desde hace más de dos años. El tanque LP5 recibe alimento natural (calamar, chipirón y gusana) y el tanque LP6 dieta comercial, al 1% de la biomasa. Estos ejemplares estaban marcados y mensualmente se muestrearon en talla y peso, así como se determinó el estado de maduración de las hembras. En el caso de los machos, se anestesiaron con aceite de clavo (40 ppm) para la obtención del esperma que se realizó, tras secar el poro genital, mediante masaje abdominal recogiendo el esperma con jeringuilla de 1 mL, desprovista de aguja y evitando la contaminación por orina. Además de realizar un estudio de la calidad de esperma mensualmente, se tomaron muestras de sangre de todos los ejemplares para la determinación de esteroides. Para ello, se extrajo ~ 0.6 mL de sangre de cada ejemplar mediante la inserción de jeringuillas heparinizadas cerca de la línea lateral y en la parte posterior media-caudal; la muestra de sangre se vertió en un tubo eppendorf de 1,5 mL al que previamente se había añadido 10 µl de heparina (anticoagulante de la sangre) y 10 µl de aprotinina (para evitar la desnaturalización de la VTG) y conservado en frío. Posteriormente, los tubos se centrifugaron a 3.000g, 4° C durante 15 minutos y el sobrenadante se guardó en varias alícuotas en tubos eppendorf de 0,5 mL que se guardaron a -80 °C. El plasma sanguíneo se mandó en hielo seco al IATS (Castellón), donde se realizaron los análisis de niveles de esteroides sexuales (E2, T, 11KT y MIS) y vitelogenina (VTG) por ELISA.

En los experimentos para determinar si el ritmo de reproducción del lenguado persiste bajo condiciones constantes de fotoperíodo y en su caso, si su periodicidad varía con respecto al ritmo observado en peces mantenidos en fotoperíodo natural fluctuante, se utilizaron reproductores F1 de 5 años de edad y peso corporal de 846±66 g en machos y 1299±77 g en hembras. Los peces se distribuyeron en 4 tanques (8 machos y 8 hembras por tanque), para constituir 2

grupos experimentales por duplicado: 1) fotoperiodo natural (control) y 2) fotoperiodo constante (12L:12D). La disposición de tanques duplicados se hizo con el fin de disponer, para cada grupo experimental, de tanques no sometidos a muestreo y destinados únicamente al estudio de puesta de huevos en condiciones de mínimo estrés. Los tanques sometidos a manipulación de fotoperiodo disponen de tapa e iluminación con tubos de tungsteno, con encendido y apagado controlado automáticamente de forma a proporcionar un fotoperiodo constante de 12 h de luz por día (12L:12D). El experimento se inició durante el equinoccio de otoño de 2010, coincidiendo con un fotoperiodo natural de 12L:12D. A partir de este momento, el grupo tratado continuó con fotoperiodo 12L:12D todo el año, mientras que el grupo control siguió en fotoperiodo natural. Todos los tanques se mantuvieron en temperatura natural. Un tanque de cada grupo experimental se muestreó mensualmente durante la época reproductiva (feb-jul 2011), para la toma de datos biométricos y muestras plasmáticas, para posterior análisis de esteroides sexuales y vitelogenina por ELISA.

En el estudio para conocer el comportamiento de lenguados F1 que hacen la puesta de manera espontánea, se realizaron grabaciones del comportamiento reproductivo del lenguado en el IEO Santander, durante el mes de mayo del 2009. Las observaciones se realizaron en un grupo de animales F1 de 6 años de edad con una proporción aproximada de 1/1 machos y hembras. Estos animales fueron estabulados en un tanque circular de 5 m³ las cámaras se situaron de forma seriada para capturar toda la columna de agua del tanque. El fotoperiodo se mantuvo constante durante todo el mes (Luz de 08:00 a 24:00) Durante las horas nocturnas fueron iluminados con un sistema de luces con filtro de luz roja Rosco Supergel (luces fluorescentes de 58 w con la pantalla cubierta con un filtro rojo supergel ROSCO, permitiendo solo el paso de radiaciones infrarrojas y de rojo profundo >720 nm. Además, la intensidad se ajusto a 5 lux \pm 1 lux y la actividad en el tanque fue grabada con una grabadora de 4 pistas, (DVR-0404HB de Dahua Technology Co. Ltda., suministrado por Praesentis S.L., Barcelona) 24 horas al día. Los animales fueron alimentados con comida fresca 6 días a la semana. Para la observación de comportamiento de un grupo de machos salvajes mezclados con hembras de origen F1 y F2 que desovaron de forma espontánea, se procedió a la grabación de su actividad reproductiva durante un mes en la primavera de 2010. Las observaciones se realizaron en un grupo de animales de diez hembras de origen F1 y F2 y seis machos de origen salvaje. Estos animales fueron estabulados en un tanque circular de 5 m³ y las cámaras se situaron de forma seriada para capturar toda la columna de agua del tanque. Las condiciones de luz y grabación fueron las indicadas anteriormente.

La influencia que la temperatura de cultivo durante el desarrollo temprano del lenguado ejerce sobre la determinación del sexo se investigó en dos experimentos en los que huevos y larvas pre-metamórficas fueron expuestas a diferentes valores de temperatura. El primer experimento contempló el tratamiento térmico de huevos recién fecundados, durante un periodo de 48 h, hasta su eclosión. En el segundo experimento los lenguados fueron expuestos a dos temperaturas diferentes durante la metamorfosis. El primer experimento se llevó a cabo con una puesta natural ocurrida en Primavera, a partir de reproductores

salvajes, mantenidos en condiciones de cautividad en las instalaciones del IFAPA Centro El Toruño. Para evitar la mezcla de huevos en diferentes estados de desarrollo, se aseguró que en los días previos al comienzo del experimento dicho lote no presentó puestas. Se emplearon 6 incubadores de 15 litros, con una densidad de 700 huevos flotantes por litro. Las temperaturas estudiadas fueron 17, 20 y 22 °C. Para cada temperatura se utilizaron 2 incubadores conectados a un módulo de recirculación de agua, provisto de un filtro mecánico, filtro biológico y ultravioleta con el fin de mantener constantes las condiciones físico-químicas y microbiológicas del agua. Además, cada módulo contaba con un sistema para la regulación térmica del agua, que permitió mantener las temperaturas ensayadas. Se mantuvo una renovación de un 1% durante todo el periodo de incubación. Durante los siguientes días, se hizo un seguimiento de las tasas de eclosión en cada uno de los incubadores para cada temperatura de estudio. Una vez finalizado el desarrollo embrionario y tomando como referencia la tasa de eclosión más baja, las larvas fueron cultivadas durante 166 días, hasta que los alevines tuvieron un tamaño suficiente para poder diferenciar el tipo de gónada.

El efecto de la temperatura durante la metamorfosis sobre la proporción de sexo se estudió en tanques de cultivo de 10 m³ en la empresa CUPIMAR (San Fernando, Cádiz), gracias a la facilidad existente en ella para un control preciso de las temperaturas experimentales en circuito abierto. El procedimiento de cultivo hasta la fase de alevín (entre 2 y 6 gramos) fue el clásico ya descrito por El Toruño, con la única salvedad de la modificación de la temperatura del agua entre los días 8 y 20 de edad, afectando específicamente al periodo de la metamorfosis del lenguado. Los tratamientos térmicos consistieron en la exposición a 16°C y 20°C durante la metamorfosis y los cultivos fueron llevados a cabo hasta que los peces alcanzaron un tamaño en el se pudo detectar la naturaleza de su gónada mediante micro disección. Los tratamientos se realizaron por duplicado.

Para la determinación del sexo mediante estudio histológico, se fijaron individuos completos en formol tamponado al 4%, que posteriormente fueron incluidos en bloques de parafina para la realización de cortes seriados con el objeto de poder establecer el momento de formación de las gónadas. La determinación anatómica del sexo se realizó mediante microdisección y análisis visual bajo lupa binocular. Se tomaron muestras para histología con el objeto de comprobar si el sexo establecido mediante la observación en lupa coincidía con el mostrado histológicamente.

2.3.2. Metodología relacionada con objetivo B (Determinar condiciones de cultivo para una óptima respuesta inmune y resistencia a patógenos en juveniles).

Los ensayos de estimulación inmune y validación estuvieron destinados para activar y potenciar la expresión de genes de defensa frente a distintos patógenos. Se utilizaron diferentes estímulos de patógenos: Zymosan A de *Saccharomyces cerevisiae* (ZYM; Z4250; Sigma-Aldrich) como estímulo de hongos; peptidoglicano de *Staphylococcus aureus* (PGN; 77140; Sigma-Aldrich) como estímulo de bacterias Gram negativas y positivas, ácido lipoteicoico de *Staphylococcus aureus* (LPT; tlr1-slt1; invivogen) como estímulo de bacterias

Gram positiva, lipopolisacárido (LPS), como estímulo de bacterias Gram negativas, y poli I:C (81354; Sigma-Aldrich)

En el primer experimento, se dispusieron 20 lenguados en cada uno de tres tanques Control, LPS y Poli I:C. El peso medio de los animales fue de $17,8 \pm 4,3$ g. Se mantuvieron en circuito abierto a una T^a de 19°C y una salinidad de 36 ppt durante 2 días. Posteriormente se les inyectó por vía intraperitoneal $100\mu\text{l}$ de PBS, de una solución de LPS (30 mg/Kg) y de una solución de poli I:C (15 mg/Kg) a cada tanque, respectivamente. Posteriormente los animales se sacrificaron a las 3, 8 y 24 horas tras la inoculación mediante inmersión en un tanque con fenoxietanol (100 ppm) siguiendo las recomendaciones establecidas a tal efecto por la UE 2007/526/EC y COD/2008/0211. De cada ejemplar, se tomó por independiente el riñón, bazo, timo, branquia y cerebro, que se congelaron rápidamente en nitrógeno líquido y se almacenaron a -80°C hasta su uso. En el segundo experimento, se dispusieron 8 tanques de 100 L con 18 lenguados cada uno. Las condiciones ambientales fueron como las del experimento 1. El peso medio de los lenguados fue 34 ± 8 g. Los animales se adaptaron en los tanques durante 5 días antes de comenzar la experiencia. Para la inoculación, dos tanques con 18 lenguados se utilizaron de control y se inyectó con PBS, dos tanques se inyectaron con LPT (0,14 mg/ $100\mu\text{l}$), dos tanques con PGN (0,3 mg/ $100\mu\text{l}$ ~ 10 mg/Kg) y los otros dos tanques se inyectaron con zymosan A (1,2 mg/ $100\mu\text{l}$ ~ 40 mg/Kg). Las muestras se recogieron a la 1-1:30h, 3h, 5h, 12h, 24h y 48h. Los animales se sacrificaron como se describió arriba tomando de cada uno riñón, timo, cerebro, branquia y bazo de 6 individuos de cada condición experimental para cada tiempo. Para confirmar que se había conseguido una estimulación correcta del sistema inmune innato, se cuantificó la expresión de la lisozima g, hepcidina (hamp1) y de la fracción C3 del complemento (C3). Estos genes se relacionan con la respuesta frente a bacterias aunque pueden responder también a estímulos de otros patógenos. Para ello, se aisló ARN mediante el kit RNeasy Mini (Qiagen) siguiendo las instrucciones del fabricante.

Para conseguir una adecuada caracterización del sistema inmune innato de lenguado se realizó un análisis transcriptómico basado en las últimas tecnologías de secuenciación masiva tipo 454. Para ello, el ARN total procedente de los 5 tejidos tomados de lenguados estimulados mediante LPS, poli I:C, PGN, LPT y ZYM se juntaron en proporciones iguales en cantidad suficiente para realizar un procedimiento de normalización basado en el sistema de Evrogen. Las muestras se enviaron al servicio de secuenciación de la Universidad de Barcelona y se hizo una carrera completa de pirosecuenciación obteniendo 1.268.785 lecturas al azar con una longitud media de 221,4 nucleótidos.

Con el fin de eliminar secuencias repetidas, contaminantes de vectores empleados en la creación de las librerías para la secuenciación, adaptadores para la normalización y secuencias de orgánulos con ADN como la mitocondria se utilizó el software SEQTRIMNEXT disponible en el SCBI de la Universidad de Málaga. La estrategia más optimizada produjo un total de 786.178 secuencias limpias que representaban tan solo el 62% de las secuencias suministradas. El 17,8% de las secuencias eliminadas fueron repeticiones y el 4,7% secuencias de

baja complejidad. Para el ensamblaje de las secuencias útiles se hizo un primer análisis muy restrictivo por similitud basado en el programa MIRA. En total, se obtuvieron 96.547 unigenes. Además, de las secuencias descartadas como residuos se rescataron un 13,3% aunque la mayoría no se consideraron unigenes sino singulones. En total, se obtuvieron 7.705 unigenes de más de 500 nucleótidos siendo el mayor de 1.934 nucleótidos.

Para la anotación de secuencias se siguió una triple estrategia: a) AUTOFACT, un sistema jerárquico discriminativo que analiza en paralelo 7 bases de datos públicas; b) Blast2GO basado en un sistema exclusivo de BlastX; c) Full-lengther que utiliza bases de datos de proteínas completas filtradas a partir de las bases de datos del UniProt. Se obtuvo un total de 18.474 unigenes con similitud a otros vertebrados. Además se identificaron los polimorfismos de nucleótido por cada unigene (SNPs) y la presencia de microsatélites (SSRs) (Tabla 5).

Para favorecer el manejo de la información generada, todos los ensamblajes se han integrado en la base de datos SOLEADB disponible en <http://www.juntadeandalucia.es/agriculturaypesca/ifapa/aquagenet/soleaDB>. En dicha base de datos se podrá acceder a los ensamblajes en formato .ace así como a las anotaciones y conexiones a las bases de datos Gene Ontology, InterPro y KEGGs.

En el estudio sobre modulación de la expresión génica por los corticoides como mediadores de la respuesta de estrés se realizó un experimento destinado a conocer el papel de la dexametasona (DXM), un potente corticoide, en la genes del sistema inmune innato así como del eje hipotalámico-hipofisario-interrenal, GH-IGF y hipotalámico-hipofisario-tiroideo. Se utilizaron alevines post-metamórficos de una edad de 20 días tras la eclosión. Dichos animales se expusieron a tres dosis de DXM (Sigma-Aldrich, Ref D1756) por triplicado: 0,1, 1 and 10 ppm. Además, se incluyó un control (0 ppm) al cual también se le añadió etanol absoluto (en la que se disolvió la DXM). Las larvas se muestrearon a las 6, 12, 24, 48 and 72 horas tras el tratamiento aunque sólo se analizaron las de los últimos tres tiempos. Un total de seis individuos se anestesiaron mediante MS-222 y se introdujeron independientemente en tubos eppendorf, se congelaron en nitrógeno líquido y se almacenaron a -80°C hasta su uso.

Con el fin de poder comparar los niveles de expresión de genes del sistema inmune innato bajo un sistema intensivo y extensivo de producción se llevó a cabo un experimento en el que animales con un peso medio de $4,5 \pm 0,3$ g se distribuyeron al azar para formar dos lotes. El primero se cultivó bajo condiciones extensivas en 4 tanques de hormigón con fondo fangoso de 100 m^2 (Figura 17). Un mes previo al inicio del experimento, se activó la circulación de agua en tanques para favorecer el crecimiento de fitoplancton y zooplancton para la alimentación de los lenguados. Los animales utilizados al comienzo de la experiencia presentaron un peso medio de 4.5 ± 0.3 g. Para el extensivo, se sembraron 300 animales en cada tanque en Mayo (Día 7). En dos de ellos, los animales no se vacunaron. En los otros dos, se les administró una doble vacunación frente a *Photobacterium damsela piscicida* (PHD). Para el sistema

intensivo, los animales se dispusieron en 4 tanques (700 animales/tanque): 2 sin vacunar y 2 vacunados como el extensivo. En ambos casos el fotoperíodo fue natural. Los animales bajo ambas condiciones se muestrearon para peso y talla así como para la toma de muestras a la siembra, 20 (Mayo), 43 (Junio), 114 (Agosto), 154 (Octubre) y 196 (Noviembre) días post siembra. Al final del experimento (196 días post siembra) la supervivencia media fue 12,7% y del 89% para extensivo e intensivo respectivamente. Para determinar el efecto del sistema de producción en el sistema inmune se cuantificaron los niveles de ARN mensajero de la lisozima g, hepcidina y C3 en el riñón de ejemplares cultivados bajo ambos sistemas hasta los 196 días post-siembra. La metodología seguida fue la misma que la descrita para la experiencia 1. En este caso, la normalización se hizo usando como gen de referencia el 18S ARNr.

Para el estudio sobre la expresión de genes durante la ontogenia del sistema inmune se incubaron huevos fertilizados procedentes de una puesta natural del lote de reproductores del centro IFAPA El Toruño (El Puerto de Santa María, Cádiz). Los huevos se incubaron a una densidad de 2.000 huevos/L en tanques cilindro-cónicos con aireación suave y intercambio de agua cada 2 h. La temperatura y salinidad durante los experimentos fueron de 20 °C y 37 ppt respectivamente. Las larvas eclosionadas se trasladaron a tanques de 400 L con una densidad inicial de 45-50 larvas/L con una intensidad continua de luz de 600-800 lux. Las condiciones de cultivo larvario fueron similares a las descritas por Fernández-Díaz et al., 2001. La toma de muestras de larvas se realizó cada 2 días desde los 2 días hasta los 21 días tras la eclosión tomando en cada punto un pool de larvas, que fueron concentradas mediante una malla enjuagadas con agua tratada con DEPC (Dietilpirocarbonato), congeladas en nitrógeno líquido y mantenidas a -80°C hasta su análisis. Además, se registró la evolución de la metamorfosis según los estadios en función de la migración del ojo. La monitorización de la ontogenia del sistema inmune innato se definió en base a la expresión de la lisozima g, la hepcidina y la fracción C3. La extracción de ARN, síntesis de cDNA y cuantificación se realizaron tal como se describió anteriormente. La normalización se realizó con la gliceraldehido deshidrogenasa 2.

En la determinación de indicadores de estrés en *Solea senegalensis* se utilizó la proteína Steroidogenic Acute Response Proteín (STAR), la cual está directamente relacionada con el transporte del colesterol a la mitocondria para la producción de cortisol y es ampliamente utilizada como indicador de respuesta de estrés. Por otro lado, también se emplearon los receptores de glucocorticoides (GR) 1 y 2, los cuales han sido secuenciados en el presente estudio.

El diseño de oligos de la STAR se llevó acabo a partir de la secuencia completa de sus bases publicadas en el GenBank : Acc no HQ392856.1. Los oligos (SSE_STAR1) fueron diseñados a través del programa Oligo v6.89 (Medprobe), adaptándolos a las condiciones concretas para PCR r-t: Desnaturalización y activación enzimática durante 7 min a 95°C, seguido por 40 ciclos a 95°C durante 15 segundos y 70°C durante 30 segundos.

FORWARD: 5' GCGACACGATCATCACTCACGA 3'
REVERSE: 5' CAGGAAATCCCTTTGGCCGAT 3'

Se diseñaron los oligos para PCR r-t teniendo presente que la T_m del forward y el reverse no debe diferir en más de 1 grado de temperatura. La T^a de annealing debe mantenerse en un margen que se encuadre alrededor de los 70 °C, temperatura. Tanto el forward como el reverse deben poseer en su composición más de un 50% de G+C, puesto que proporcionan enlaces triples, fortaleciendo la unión de los oligos con la secuencia de bases del cDNA. Una vez diseñado los oligos, para comprobar su eficiencia se utilizan diluciones seriadas y por triplicado de una muestra de referencia y se calcula la pendiente de la recta de regresión obtenida al representar los valores de Ct frente al logaritmo de la concentración inicial de cDNA.

Los genes GR1 (glucocorticoid receptor 1) y GR2 (glucocorticoid receptor 2) han sido clonados y secuenciados parcialmente a partir de secciones conservadas del GR en otras especies de peces planos. Para su clonación se empleó cDNA larvario de *Solea senegalensis* con el TOPO TA cloning kit (Invitrogen™), utilizando para su amplificación el 3' RACE System for Rapid Amplification of cDNA Ends (Invitrogen™) y 5' RACE System for Rapid Amplification of cDNA Ends (Invitrogen™). Por último, se secuenciaron parcialmente ambos genes y han sido recientemente publicados, en el Genbank: AB614369.1 (GR1) y AB614370.1 (GR2). Los oligos (SSE_GR1 y SSE_GR2) para PCR r-t fueron diseñados a través del programa Oligo v6.89 (Medprobe) adaptándolos a nuestras condiciones generales para PCR r-t, mencionadas anteriormente.

La acción combinada de la utilización de aceites vegetales y la manipulación sobre la respuesta a estrés en juveniles de *Solea senegalensis* se estudió en un conjunto de 270 juveniles con un peso medio inicial de 3.5 ± 0.24 g, los cuales fueron cultivados durante 3 meses en tanques de 45 l. Los peces fueron repartidos de manera equitativa en 9 tanques ($n = 30$ animales/tanque). Todos los tanques fueron alimentados a saciedad, con un mínimo del 2% del peso corporal/día, con las dietas experimentales (triplicado por tratamiento). Las dietas experimentales fueron diseñadas según los estándares comerciales para esta especie, con 50 % de proteína y un 12% de lípido. La dieta control estaba basada en aceite de pescado (Dieta FO), mientras que las otras dos dietas estaban basadas en la sustitución total de aceite de pescado por aceite de lino (Dieta LO) o aceite de soja (Dieta SO). Al final del periodo de engorde, se muestrearon 10 animales por tanque (triplicado por tratamiento) para estudios bioquímicos y de composición de ácidos grasos de hígado y músculo. Los restantes animales se agruparon en dos tanques por dieta para la realización de una experiencia de estrés por manipulación. Un tanque por cada dieta se consideró como tanque control, mientras que los animales del segundo tanque fueron sometidos a un estrés consistente en 5 minutos de persecución con red. Se muestrearon 8 peces por tanque. Los animales fueron sacrificados con una sobredosis de clorobutanol (0.7ml/l) y se recogieron muestras de hígado, músculo e intestino, conservadas en RNA later.

Para el aislamiento de RNA y análisis de la expresión génica se homogenizaron manualmente muestras de hígado, músculo e intestino (n= 8 especímenes/12 tanques; 8 especímenes por dieta control y 8 especímenes por dietas estrés; 2 tanques por dieta control y 2 tanques por dieta estrés). La subsecuente extracción de RNA se hizo siguiendo protocolo de extracción con Tri Reagent® Solution. Tras la extracción, el RNA fue tratado dos veces con RNase-Free DNase Kit (Qiagen) durante 30 minutos, chequeado en un gel de agarosa y cuantificado por determinación espectrofotométrica (nanodrop). El total de RNA (1µg) de cada muestra fue convertido a cDNA usando el Script™ cDNA synthesis kit (Bio-Rad). El análisis en PCR real-time se llevó a cabo usando un iCycler (Bio-Rad). La reacción se llevó a cabo en un volumen total de 25µl, conteniendo éste; cDNA generado a partir de 10ng de RNA original, 300nM de cada uno de los oligos específicos para cada gen (Tabla 1) y 12.5µl de iQ™ SYBER Green Supermix (Bio-Rad).

La experiencia inicialmente programada como estrés de ayuno fue sustituida por una experiencia de modulación de crecimiento y comportamiento mediante el uso de atractantes en la dieta, tras la consulta de la idoneidad de este tipo de experiencias con empresas productoras del sector. Así, se evaluó el efecto de la incorporación de diferentes aromas al pienso en parámetros de interés comercial como crecimiento, supervivencia y comportamiento. Se utilizó un total de 480 individuos de 36,3 g, repartidos aleatoriamente en 12 tanques, tres para cada dieta, con una carga inicial de 2,91 kg m⁻². Los tanques utilizados son de fondo plano y con unas dimensiones de un metro de largo por un metro de ancho y medio metro de alto. La experiencia se lleva a cabo en circuito abierto. Se trabajó con cuatro piensos distintos; un pienso control, fórmula comercial para *Solea senegalensis* y tres piensos con la misma fórmula a los que se les ha añadido distintos aromas comerciales. La dieta 1 contiene aroma de bivalvo, la dieta 2 contiene aroma de almeja y la dieta 3 aroma de poliqueto. La dosis de aroma utilizada en cada una de las dietas fue de 0,5%. El tamaño de grano de los piensos utilizados en todas las experiencias ha sido de 2mm. Durante el engorde los peces fueron alimentados “ad limitum” obteniendo tasas de alimentación en torno al 0,9% de la biomasa del tanque. Los peces fueron alimentados en un horario diurno de 16 horas, distribuyendo el pienso en cuatro tomas: 8:00h, 12:00h, 17:00h y 20:00h. Además de la recogida de datos de peso y longitud de los peces, se llevó a cabo un control diario del alimento ingerido para cuantificar el alimento

Para el marcaje y estudios de comportamiento, se utilizaron doce tanques, tres por cada tipo de pienso, con un total de 80 individuos en cada tanque. Para un mejor seguimiento de los peces, ocho peces de cada tanque, seleccionados al azar, han sido marcados externamente, representando un 10% de la población total de tanque. En el estudio, se ha seleccionado un sistema de marcaje externo invasivo consistente en unos discos laminados numerados (Floy discs) sujetos con agujas de níquel. Puesto que los números de los discos no son visibles en las grabaciones, se han colocado discos de dos colores distintos, rosa y verde, que mejoran la identificación de los peces en los videos. Con estos dos colores

dispuestos en cuatro posiciones distintas: abajo derecha, abajo izquierda, arriba derecha y arriba izquierda se marcaron el total de ocho peces por tanque. Para la colocación de los marcadores los peces han sido previamente anestesiado. Cada pez marcado a su vez a sido pesado y medido.

El estudio de comportamiento alimenticio se realizó por el método de la observación directa, realizando grabaciones con una videocámara. El seguimiento individual de los ejemplares se realizó mediante el marcaje del 10% de los individuos de cada tanque. Las observaciones se realizaron siempre durante la segunda toma de pienso (12:00h) para compensar el efecto de un apetito excesivo (en la primera toma) o de la saciedad (última toma). Las observaciones tienen un tiempo de duración de 30 minutos, al cabo del se recoge el pienso sobrante del fondo del tanque. En el caso de que los peces acaben el pienso antes de los 30 minutos la observación se da por concluida anotándose el tiempo que ha transcurrido.

El diseño y puesta a punto de primers para distintos genes de la cascada de eicosanoides en *Solea senegalensis*, así como los receptores de prostaglandinas en diferentes tejidos se realizó con el kit para clonación TOPO TA Cloning kit for Sequencing (Invitrogen™). Tras realizar la clonación y secuenciación parcial de dichos genes se diseñó y se puso a punto oligos para estos y otros genes cuyas secuencias sí están publicadas en lenguado senegalés y que también se encuentran relacionados con el papel regulador de la cascada de eicosanoides en la respuesta de estrés y también con algunos aspectos del metabolismo lipídico.

El efecto del choque térmico sobre la respuesta a estrés en juveniles de *Solea senegalensis* se estudió con 168 juveniles con un peso medio de $62,29 \pm 21,66$ g y aclimatados durante 29 días en tanques rectangulares de 45 l de capacidad. Los peces fueron repartidos de manera equitativa en 24 tanques (N=7 animales/tanque). Todos los tanques fueron alimentados con una ración del 2% del total de la biomasa contenida en el tanque con 1 dieta comercial. 12 de los 24 tanques fueron sometidos a un incremento de 5° C, hasta alcanzar una temperatura de 24 °C, en 45 minutos, mientras que los otros 12 se mantuvieron a la temperatura de 19°C, siendo considerados como animales control. Se obtuvieron cuatro puntos de muestreo (triplicados para cada punto): inmediatamente después de alcanzarse la temperatura de 24° C, y después de 1, 2 y 7 días tras el choque térmico, de manera que se obtienen valores a 19° y a 24° C. Los animales experimentales fueron sacrificados con una sobredosis de cloro butanol (0.7ml/l), con un tiempo de manipulación entre captura y sacrificio de menos de 1 minuto, cumpliendo con los protocolos y requisitos sugeridos por el comité de bioseguridad. En cada punto de muestreo se sacrificaron 7 peces por tanque, triplicado para cada tratamiento (19 y 24°C). Para el análisis tisular de expresión génica, se utilizaron 4 peces por tanque (triplicado para cada punto y tratamiento, tomando muestras de hígado, músculo, intestino y cerebro que fueron rápidamente diseccionados y conservados en RNA later. Se utilizaron otros 3 peces por tanque (triplicado para cada punto de muestreo y tratamiento) para el

análisis histológico, conservando muestras de hígado, músculo, intestino y cerebro en formol tamponado al 4%.

La expresión relativa de los diferentes genes estudiados se calculó siguiendo el método comparativo ct ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) descrito por Livak y Schmittgen. Los valores Ct de cada gen para control (temperatura 18°C) y estresados (temperatura 24°C) fueron normalizados con respecto al gen housekeeping y calculados por la diferencia entre los peces estresados y los controles para cada gen y cada tejido.

Se analizó histológicamente el intestino e hígado de 3 peces de cada tanque (9 por tratamiento y punto de muestreo) al inicio y al final de la experiencia con objeto de valorar la incidencia del cambio de temperatura en la integridad del tejido. Para ello se fijaron las muestras de tejido en formol tamponado y se procedió a realización de cortes histológicos y tinciones de hematoxilina-eosina, con la posterior valoración al microscopio de las incidencias encontradas entre los diferentes grupos experimentales.

La investigación sobre las bacterias que producen bacteriocinas contra *Vibrio harveyi* (potencial patógeno para peces) se realizó con 343 cepas de bacterias aisladas en el proyecto JACUMAR PRODINLENG. Dichas estirpes fueron analizadas para determinar si tienen la característica de inhibición del crecimiento del patógeno *V. harveyi*. Las bacterias se crecieron en TSB+1.5%NaCl a 22°C y a las 24h, se tomaron 5 μ l que se sembraron sobre placas de TSA+1.5%NaCl. Se dejaron secar al aire (en campana) y luego se incubaron a 22°C, 24h. Después se añadieron 12 ml de TSA+NaCl suave (TSB con 5 g de agar/L) mezclados con 240 μ l de cultivo de *V. harveyi* (24h a 22°C) en TSB+NaCl. Al día siguiente la presencia de bacteriocinas está indicada por la inhibición de crecimiento de *V. harveyi* alrededor del área donde se sembró la bacteria a investigar.

El establecimiento del protocolo óptimo de incorporación del probiótico Pdp11 (*Shewanella putrefaciens*) mediante adición en fresco o liofilizado en alimentos para preengorde de lenguado se realizó con ejemplares de 10.5 ± 4.5 g de peso inicial que se distribuyeron en tanques de 150L (200 alevines/m²) según duplicados. La duración de la misma fue de cuatro meses (dos con adición de probiótico y posteriormente dos con pienso control). Se prepararon cuatro dietas a partir de pienso Gemma 1.8 Diamond (55% proteínas, 15% lípidos, Skretting): control, control-alginato, Pdp11 fresco y Pdp11 liofilizado. La temperatura estuvo regulada (18.0 ± 0.5 °C). Se dispuso además un tanque suplementario por dieta para la realización de la challenge y de los estudios de evolución de la microbiota digestiva y de la respuesta inmunológica. Los ejemplares no fueron alimentados el día anterior al muestreo y fueron anestesiados con aceite de clavo (40ppm) para la extracción de muestras. Dada la protección conferida por este probiótico sobre juveniles de lenguado tras sesenta días de adición, en este experimento se redujo el tiempo de dosificación de probiótico a quince días, tras los que se realizó la infección experimental (i.p.) con *P. damselae* (2.4×10^5 ufc/g) según replicados. Las mortalidades fueron registradas diariamente durante dos semanas y se estudió la presencia del patógeno en hígado, riñón y bazo de los individuos afectados.

Finalmente se calcularon los porcentajes de supervivencia relativos (RPS). Esta actividad fue realizada en el Departamento de Ciencias y Técnicas del Agua y del Medio Ambiente perteneciente a la Universidad de Cantabria.

El crecimiento se evaluó mediante muestreos biométricos de todos los ejemplares de cada lote cada tres semanas y se analizaron los siguientes parámetros: Longitud total (L), Peso medio (P) y tasa específica de crecimiento (% diario). La supervivencia fue determinada al final de la experiencia. Tras dos meses de adición de probiótico se tomaron muestras para la realización de los estudios histológicos, microbiota digestiva, inmunológicos y metabólicos. Asimismo, a los 15 días de añadir Pdp11 y tras 30-60 días a partir de la última adición, se tomaron muestras para observar la evolución tanto de la microbiota digestiva como de la respuesta inmune. Las muestras de digestivo (12 ejemplares/tratamiento) fueron fijadas en formol tamponado al 10% y almacenadas hasta su posterior análisis histológico. Para los estudios metabólicos (glucosa, glucógeno, lactato, proteínas, aminoácidos, triglicéridos y ácidos grasos) se extrajeron muestras de plasma, hígado y músculo de siete ejemplares por tratamiento y se congelaron a -80°C hasta su posterior análisis en el Departamento de Biología de la Facultad de Ciencias del Mar de la Universidad de Cádiz.

La respuesta inmune se estudió en el suero de diez ejemplares por tratamiento, a los que se extrajo sangre de la vena caudal con jeringuilla, se introdujo en viales Sarstedt y se dejó coagular a temperatura ambiente durante 3-5 horas. Posteriormente se centrifugó a $6000 \times g$ (4°C) durante 20 minutos y se extrajo el suero, introduciéndolo en tubos eppendorf de 1mL, que fueron conservados a -80°C hasta el análisis de anticuerpos específicos y totales y actividad lisozima. La evolución de la microbiota digestiva se estudió en diez ejemplares por tratamiento. Una vez extraído el digestivo fue conservado a -80°C hasta su análisis posterior mediante electroforesis en gel con gradiente desnaturizante (DGGE). Se calculó el Coeficiente de similitud de Dice en los patrones de bandas que posteriormente fueron agrupados en dendogramas tras la aplicación del UPGMA mediante el programa estadístico FPQuest 4.5. Estas dos últimas determinaciones se realizaron en el Departamento de Microbiología de la Universidad de Málaga.

La influencia del probiótico Pdp11 sobre el estado inmune y la capacidad de defensa durante el engorde de lenguado cultivado a baja y alta densidad se estudió con ejemplares de $22.7 \pm 1.6\text{g}$ de peso inicial que se distribuyeron en tanques de 150 L (21.7 Kg/m^2 inicial) y 400 L (6.4 Kg/m^2) según duplicados. La renovación ($200\%/hora$) y la temperatura ($19.2 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$) estuvieron reguladas a lo largo de los dos meses que duró la experiencia. Los ejemplares fueron alimentados (3.5%) con pienso LE 2 Elite (57% proteínas, 18% lípidos, Skretting) según 8 tomas diarias. El probiótico se incorporó al pienso con alginato sódico cada 3 días, manteniéndose a 4°C hasta su utilización. Este procedimiento permite una viabilidad del probiótico en el pienso adecuada, de más de 20 días. La supervivencia fue evaluada diariamente, con especial interés en el caso de los ejemplares cultivados en alta densidad, donde a los 9 días se presentó una

infección natural. A partir de éste momento se observó la sintomatología y se tomaron muestras de heridas y órganos internos de los ejemplares infectados, que fueron sembradas en TSAs. La determinación del patógeno se realizó en el Departamento de Microbiología de la Universidad de Málaga. En el caso de los ejemplares cultivados a densidad baja, a las 3 semanas del comienzo de la experiencia se llevó a cabo una infección experimental (i.p.) con *P. damselae* ($2.4 \cdot 10^5$ ufc/g) según replicados. Las mortalidades fueron registradas diariamente durante dos semanas y se estudió la presencia del patógeno en hígado, riñón y bazo de los individuos afectados. Finalmente se calcularon los porcentajes de supervivencia relativos (RPS). Esta actividad fue realizada en el Departamento de Ciencias y Técnicas del Agua y del Medio Ambiente perteneciente a la Universidad de Cantabria.

Para evaluar el efecto sobre el crecimiento se realizaron muestreos biométricos mensuales de todos los ejemplares de cada lote y se analizaron los siguientes parámetros: Longitud total (L), Peso (P) y tasa específica de crecimiento (% diario). Los ejemplares recogidos para extracción de muestras, no recibieron alimento el día anterior, siendo previamente anestesiados con aceite de clavo (40ppm). Para los estudios metabólicos (glucosa, glucógeno, lactato, proteínas, aminoácidos, triglicéridos, y ácidos grasos) se extrajeron muestras de hígado, músculo y plasma de 12 ejemplares por tratamiento. Asimismo, se extrajo plasma para la determinación de cortisol. Todas las muestras se congelaron a -80°C hasta su posterior análisis en el Departamento de Biología de la Facultad de Ciencias del Mar y Ambientales de la Universidad de Cádiz. Las muestras de digestivo (12 ejemplares/tratamiento) fueron fijadas en formol tamponado al 10% y almacenadas hasta su posterior análisis histológico en el Departamento de Anatomía Patológica del hospital Universitario Marqués de Valdecilla.

La respuesta inmune se estudió en el plasma de 12 ejemplares por tratamiento, a los que se extrajo sangre de la vena caudal con jeringuilla, previa limpieza del mucus existente en la zona de extracción. La sangre así obtenida se centrifugó y se extrajo el sobrenadante en tubos de 1 mL, conservándose a -80°C hasta su posterior análisis. La evolución de la microbiota digestiva se estudió en 12 ejemplares por tratamiento. Una vez extraído el digestivo se conservó a -80°C hasta su análisis posterior mediante electroforesis en gel con gradiente desnaturizante (DGGE). Se calculó el Coeficiente de similitud de Dice en los patrones de bandas que posteriormente fueron agrupados en dendogramas tras la aplicación del UPGMA mediante el programa estadístico FPQuest 4.5. Tanto el estudio de la respuesta inmune como la evolución de la microbiota digestiva se realizó en el Departamento de Microbiología de la Universidad de Málaga.

La influencia del probiótico Pdp11 sobre el estado inmune y la capacidad de defensa durante el engorde de lenguado en alta densidad y sometido a estrés agudo continuado durante 15 días se estudió en dos experimentos de estrés seriados en el C.O. de Santander entre los meses de Febrero y Abril de 2011. En el primer experimento 1, los lenguado de $136.2 \pm 31.7\text{g}$ de peso inicial se distribuyeron en tanques de 400 L ($21.9 \pm 0.0 \text{ Kg/m}^2$) según duplicados. La temperatura estuvo regulada ($18.0 \pm 0.3^{\circ}\text{C}$) a lo largo de los dos meses que duró la

experiencia. Los ejemplares fueron alimentados con pienso LE Elite (57% proteínas, 18% lípidos, Skretting) al 2.5% mediante comederos automáticos. Se establecieron dos grupos: Control y Probiótico. La adición de probiótico fue diaria y continua a lo largo de toda la experiencia. El probiótico se incorporó al pienso con alginato sódico cada 3 días, manteniéndose a 4°C hasta su utilización. Este procedimiento permite una viabilidad del probiótico en el pienso adecuada. Al cabo de 45 días de confinamiento en alta densidad se procedió a realizar un estrés agudo continuado durante 15 días. Dicho estrés consistió en perseguir a los peces durante tres minutos 3 veces por semana (L, X, V) y exposición al aire durante 1 minuto (M y J). Transcurridos los 15 días de estrés agudo se procedió a la toma final de muestras. Los controles de crecimiento y supervivencia se realizaron según se detalló anteriormente. Los ejemplares recogidos para extracción de muestras (días 0, 15 y 60) no recibieron alimento el día anterior, siendo previamente anestesiados con aceite de clavo (40ppm). La determinación de parámetros metabólicos (glucosa, glucógeno, lactato, proteínas, aminoácidos, triglicéridos, y ácidos grasos) se llevó a cabo de la misma manera ya indicada. Para la respuesta inmune innata (actividades lisozima, antiproteasa y complemento) se recolectó el plasma de 12 ejemplares por tratamiento conservándose a -80°C hasta su posterior análisis. El efecto del estrés agudo continuado sobre la expresión de proteínas (Western-Blot) se estudió tanto en el suero como en el hígado de los ejemplares. La evolución de la microbiota digestiva a nivel del intestino anterior y posterior se estudió en 6 ejemplares por tratamiento siguiendo procedimientos similares a los ya descritos.

El segundo experimento tuvo una duración de dos meses (Febrero-Abril de 2011), y se realizó en el C.O. de Santander. Lengüados de 137.2 ± 31.9 g de peso inicial se distribuyeron en tanques de 400 L a baja densidad (9.6 ± 0.2 Kg/m²) durante 15 días. Transcurrido este tiempo los individuos se concentraron a razón de 21.7 ± 0.3 Kg/m². La temperatura fue de 18.0 ± 0.3 °C. Los ejemplares fueron alimentados con pienso LE Elite (57% proteínas, 18% lípidos, Skretting) al 2.5% mediante comederos automáticos. La adición de probiótico se realizó de forma continua sólo durante los primeros quince días de experiencia, en condiciones de baja densidad. El protocolo de incorporación del probiótico fue similar al descrito en el anterior experimento. El crecimiento en peso y la supervivencia fueron determinados tras el suministro probiótico a días 0, 20 y 50 después del mismo. Los ejemplares recogidos para extracción de muestras (días 0, 15, 35 y 65) no recibieron alimento el día anterior, siendo previamente anestesiados con aceite de clavo (40ppm). Se investigaron los mismos parámetros que en el primer experimento.

2.4. RESULTADOS

2.4.1. RESULTADOS RELACIONADOS CON OBJETIVO A. Conseguir reproducción controlada en cautividad con ejemplares de lenguado procedente de cultivo.

2.4.1.1. Resultados para el objetivo A.1. Búsqueda de terapias hormonales para facilitar ovulación, espermiación y desove natural.

Tratamiento hormonal de machos de lenguado para mejorar su reproducción.

El tratamiento con gonadotropina corionica humana (hCG), administrado mediante inyecciones semanales (1.000 iu/kg), estimuló los niveles hormonales pero no afectó a la espermiación en machos F1 de lenguado. Los niveles plasmáticos de esteroides sexuales en el grupo control no variaron a lo largo del experimento (Figura 1). El tratamiento hCG con 1.000 iu/kg, pero no con 250 y 500 iu/kg, indujo elevación en los niveles de andrógenos (11KT y T). Sobre los niveles de MIS, se observó una elevación a día 14 en los grupos tratados con 500 y 1.000 iu/kg. Independientemente de la dosis administrada, el mayor efecto sobre la secreción de esteroides se observó a las dos semanas después de iniciar los tratamientos. Respecto a los parámetros espermáticos (Figura 2), se observó una estimulación en la producción de esperma (volumen) en los machos tratados con las dosis altas (500 y 1000 iu/kg) con respecto a la dosis menor y controles, aunque esta diferencia no fue estadísticamente significativa ($p < 0.05$). La densidad y movilidad espermática no se vió afectada por los tratamientos hCG.

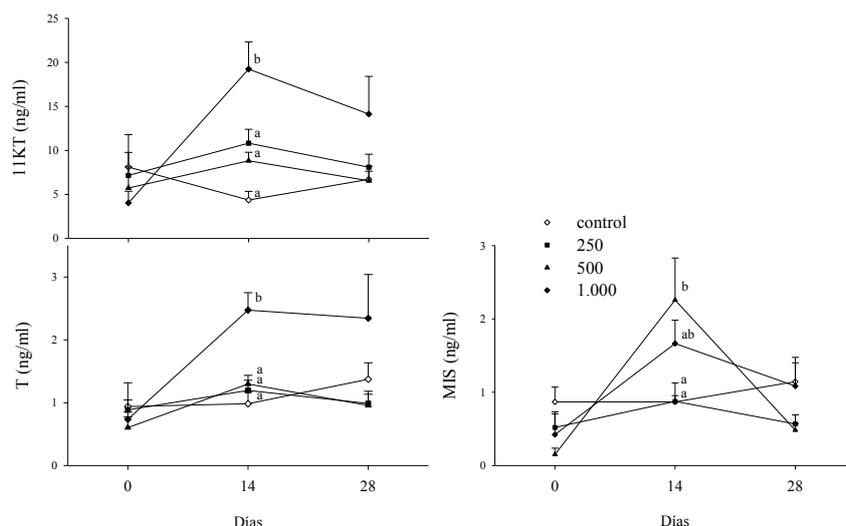


Figura 1. Niveles plasmáticos de 11-ketotestosterona (11KT), testosterona (T) y 17,20P (MIS) en machos F1 tratados con salino (control) o tres dosis de hCG (250, 500 y 1.000 IU/kg). Las letras minúsculas indican diferencias significativas ($p < 0,05$) entre grupos para un punto de muestreo. Datos expresados como media \pm SEM ($n=6$).

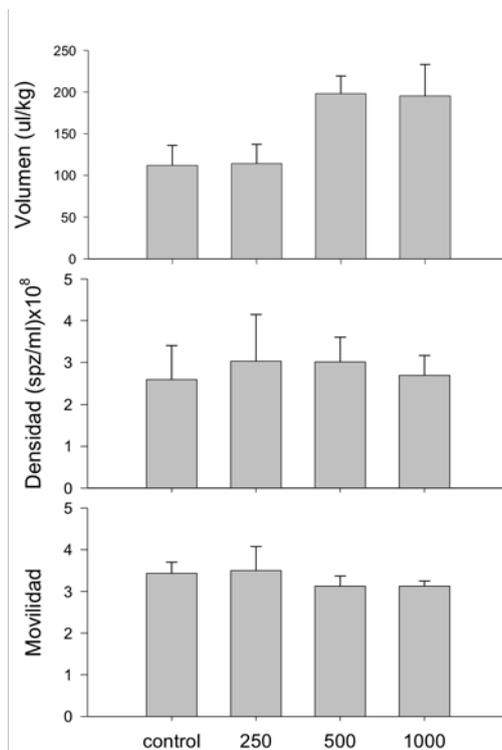


Figura 2. Parámetros espermáticos en machos F1 tratados con salino (control) o tres dosis de hCG (250, 500 y 1.000 IU/kg). No hubo diferencias significativas entre grupos en ninguno de los parámetros estudiados. Datos expresados como media \pm SEM (n=6).

La utilización de hCG solo en machos si tuvo un efecto sobre las puestas en los tanques donde se ubicaron los machos tratados (Figura 3, Tabla I). Se observaron diferencias en el número de puestas y la duración del periodo de puesta, pero sobre todo, se apreció un aumento en la fecundidad de los grupos tratados, es decir, de las hembras que comparten tanque con machos inducidos hormonalmente, con respecto a aquellas que comparten tanque con machos control (no inducidos con hCG). Concretamente, la fecundidad total fue entre 1,5 y 2,7 veces superior en los tanques tratados que en el control, aunque no se correlacionó con la dosis de hCG. Este efecto ya se ha observado en experimentaciones previas y se supone debido a la comunicación feromonal entre los sexos de la población.

Tabla I. Datos de puestas obtenidas durante el experimento de inducción de espermiación. Datos de fecundidad diaria y flotabilidad expresados como media \pm SEM.

Tratamiento	Salino	hCG (250 iu)	hCG (500 iu)	hCG (1000 iu)
Nº de puestas	3	9	7	3
Nº de huevos	105.000	305.000	228.000	190.000
Fecundidad total (huevos/kg)	12.605	33.889	24.756	19.153
Fecundidad diaria (huevos/kg)	4.202 \pm 2.751	3.765 \pm 1.322	3.537 \pm 827	6.384 \pm 5.630
% Flotabilidad	37,5 \pm 31,4	16,6 \pm 11,0	28,1 \pm 13,4	38,1 \pm 31,2

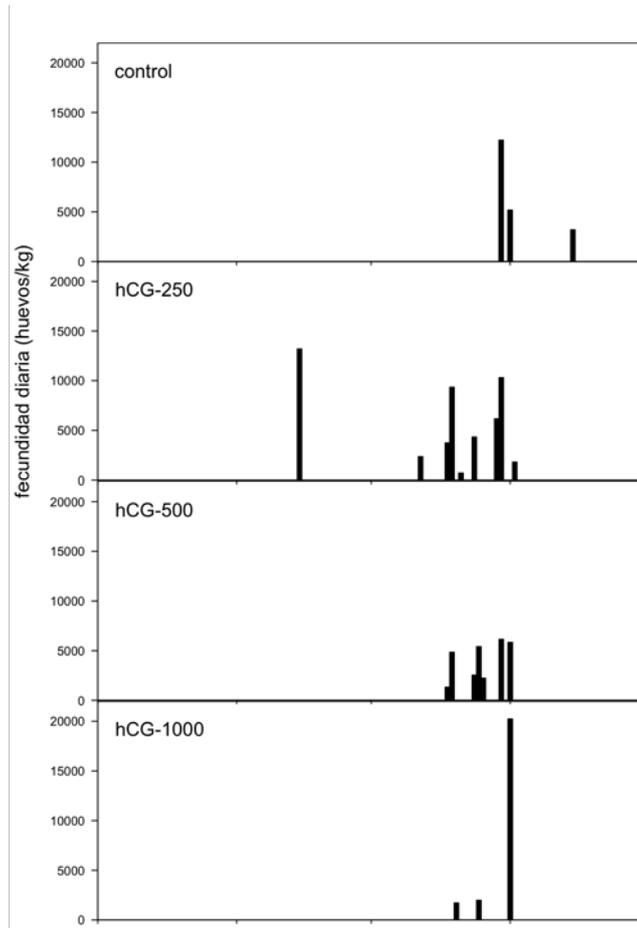


Figura 3. Puesta de huevos en los grupos de reproductores F1 en que los machos fueron tratados con salino (control) o tres dosis de hCG (250, 500 y 1.000 IU/kg).

Tratamiento hormonal de hembras de lenguado para mejorar su reproducción.

Se determinó la dosis óptima de GnRH α ([D-Ala6, Pro9Net]-LHRH, Bachem) para futuras terapias hormonales, analizando el efecto de diferentes dosis de GnRH α sobre la secreción de esteroides y ovulación en hembras. De forma similar a lo observado en experimentos previos, los tratamientos GnRH α no afectaron los niveles plasmáticos de VTG en hembras. Esto fue esperable, ya que la síntesis de VTG está ligada al proceso de vitelogénesis, previo a la posterior maduración y ovulación de los oocitos, procesos más sensibles al efecto estimulador de los tratamientos GnRH α . En cuanto a los esteroides sexuales, todas las dosis GnRH α indujeron elevación inmediata de los niveles de E2 hasta niveles máximos detectados a 11 h post-tratamiento (pt) y manteniéndose invariables y superiores a los controles a partir de entonces y hasta el final del periodo experimental (Figura 4). Con respecto del control, se detectaron diferencias significativas de los grupos tratados a 5 h pt (dosis 5 ug/kg), 24 h pt (dosis 5 y 15 ug/kg) y 48 h pt (dosis 45 ug/kg). En general, se observa un efecto similar entre las 3 dosis GnRH α . Durante las primeras 24 h el efecto de las dosis bajas (5 y 15 ug/kg) es muy similar y algo superior a la dosis alta (45 ug/kg), mientras que a las 48 h ya se observa una reducción en los niveles de E2 para la

dosis más baja. Esto apuntaría a la dosis intermedia (15 ug/kg) como óptima, produciendo mayor estimulación inmediata y más sostenida en el tiempo.

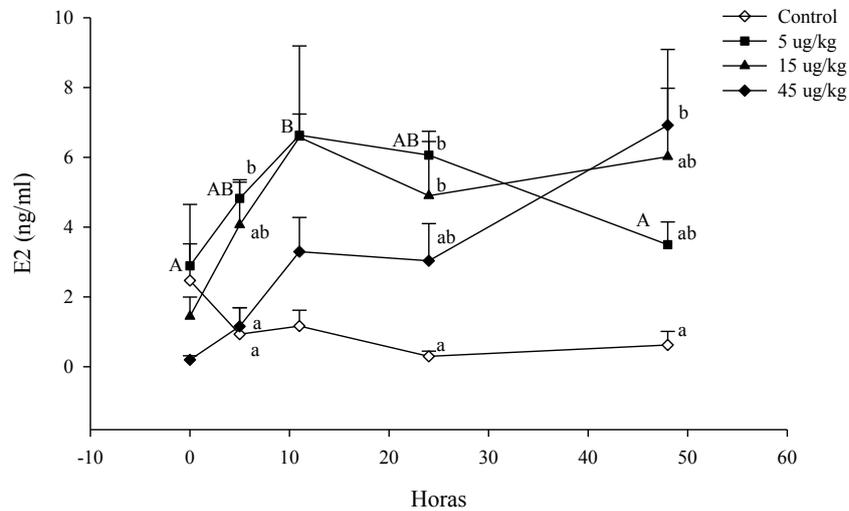


Figura 4. Niveles plasmáticos de estradiol (E2) en hembras F1 tratadas con salino (control) o diferentes dosis de GnRH α . Letras minúsculas indican diferencias significativas ($p < 0,05$) entre grupos para un punto de muestreo y letras mayúsculas diferencias en el tiempo para cada grupo. Datos expresados como media \pm SEM ($n = 6$).

De forma similar, todos los tratamientos GnRH α estimularon la secreción de T (Figura 5). Se observó elevación de T plasmática a las 5 h pt, aunque ésta sólo fue significativamente diferente del control ($p < 0,05$) para la dosis de 5 $\mu\text{g}/\text{kg}$. Los niveles de T descienden a partir de las 5 h pt en todos los grupos tratados, pero se mantienen elevados hasta 48 h pt, salvo para el grupo tratado con la menor dosis. El análisis de T apunta igualmente a la dosis de 15 $\mu\text{g}/\text{kg}$ como óptima, ya que produce una inducción de T rápida y prolongada en el tiempo y de grado similar o mayor a la obtenida con dosis mayores.

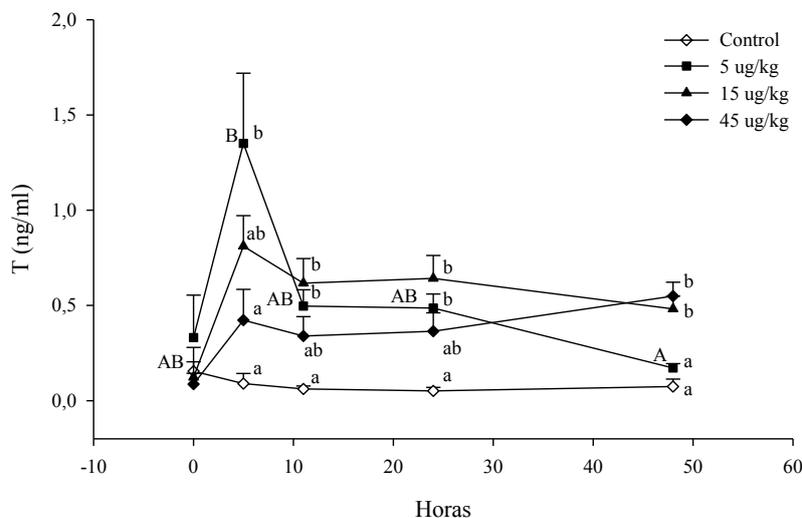


Figura 5. Niveles plasmáticos de testosterona (T) en hembras F1 tratadas con salino (control) o diferentes dosis de GnRH α .

Los niveles plasmáticos de MIS en hembras control fueron bajos e invariables en el tiempo, hasta un ligero aumento ($p < 0,05$) a 48 h pt (Figura 6). Todos los tratamientos GnRH α indujeron elevación inmediata de MIS plasmático, con máximos a 5-11 h pt, aunque estos incrementos no fueron significativos con respecto de controles. Diferencia significativa con respecto a control se detectó a 24 h pt para el grupo tratado con la mayor dosis (45 $\mu\text{g}/\text{kg}$).

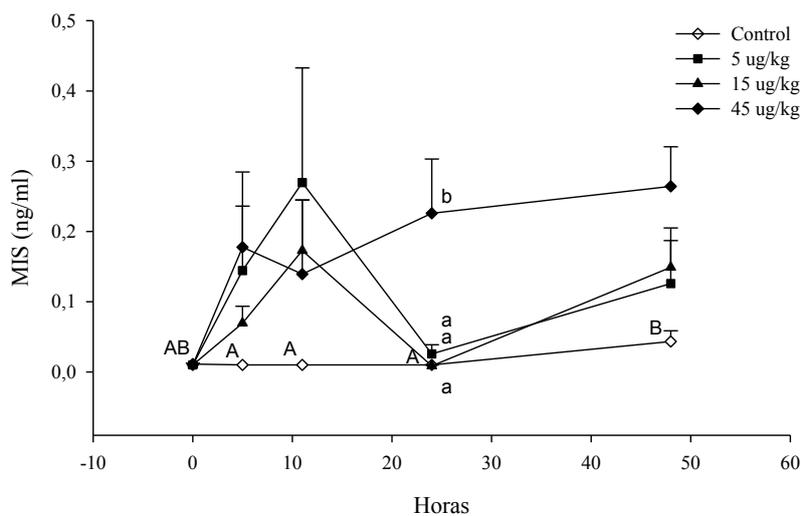


Figura 6. Niveles plasmáticos de 17,20 β P (MIS) en hembras F1 tratadas con salino (control) o diferentes dosis de GnRH α .

A las 48 y 72 h pt se realizó masaje abdominal (stripping) de aquellas hembras que mostraron mayor grado de maduración, para la detección de ovulaciones y obtención de huevos (Tabla II). En el grupo control, solo ovuló una de las ocho hembras (12% de la población) y todos fueron huevos sobremaduros (0% viabilidad). Todos los tratamientos con GnRH α indujeron ovulación en las hembras, siendo mayor el porcentaje de ovulación obtenido con la dosis media (15 $\mu\text{g}/\text{kg}$), 6 de las 8 hembras del grupo, con una producción final de huevos similar a la obtenida con la dosis baja (5 $\mu\text{g}/\text{kg}$). Peores resultados en porcentaje de ovulación y producción total de huevos se obtuvo con la dosis mayor (45 $\mu\text{g}/\text{kg}$). La viabilidad (%flotabilidad) de los huevos fue similar en todos los grupos tratados.

Los huevos obtenidos de hembras de cada grupo tratado, incluyendo de 5 (H10, H15, H17), 15 (H24, H25, H26) y 45 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (H29), se fecundaron artificialmente con esperma fresco de machos F1, para verificar su calidad. Se observó fecundación de los huevos en todos los casos, lo que demostró la viabilidad de los huevos obtenidos por stripping de estos grupos experimentales.

Tabla II. Volumen y calidad de huevos obtenidos por stripping de las hembras F1 del experimento de inducción hormonal, tratadas con salino (control) o diferentes dosis de GnRHa. Se muestran las hembras que ovularon en cada grupo (n =6 hembras por grupo). BW = peso corporal.

♀	% ovulación	BW (g)	Día 2 pt		Día 3 pt		TOTAL	
			huevos (ml)	% flotab.	huevos (ml)	% flotab.	huevos (ml)	huevos (ml/kg)
Control:	12%						65	70
H8		930	65	0			65	70
5 ug/kg:	50%						404	98
H9		880	80	80	16	50	96	109
H10		1.09	70	100	23	80	93	85
		0						
H15		970	55	100	35	80	90	93
H17		830	105	100	20	100	125	151
15 ug/kg:	75%						370	59
H18		1.11	24	100	10	0	34	31
		0						
H22		1.00			10	60	10	10
		0						
H23		870	30	100			30	34
H24		1.06	75	100	6	100	81	76
		0						
H25		970	50	100	50	100	100	103
H26		1.24	115	100			115	93
		0						
45 ug/kg:	25%						29	18
H29		610	25	80			25	41
H31		1.01	4	100			4	4
		0						
Total =			694		124		818	849
Media =		1.86	110,25	96,36	27,56	71,25	120,85	125,23
		2						
SEM =		0,04	0,01	0,01	0,00	0,01	0,01	0,01

En conclusión, todas las dosis de GnRHa testadas en el presente experimento inducen la secreción de esteroides sexuales y la ovulación en hembras F1, con respecto de controles. No se observa una diferencia relevante entre los tratamientos, siendo en algunos casos el efecto de dosis bajas igual o superior al de dosis altas, lo que indicaría que la mínima dosis testada (5 ug/kg) sería suficiente para la inducción de esteroidogénesis y ovulación en hembras.

Efecto de un tratamiento hormonal prolongado sobre la maduración gonadal en machos y hembras.

El tratamiento GnRHa mediante la aplicación de implantes de liberación sostenida (cada tres semanas) no produjo variaciones importantes en los niveles plasmáticos de hormonas sexuales durante dos meses. En hembras se observó una reducción, significativa ($p < 0,05$) en algunos casos, en los niveles de esteroides sexuales con respecto a controles (Figura 7). En machos no se observó efecto alguno de los tratamientos (Figura 8) y a las 2 semanas después

de la segunda y tercera implantación de GnRH α , no se detectaron efectos significativos del tratamiento sobre la producción de esperma, ni en los parámetros de densidad y movilidad.

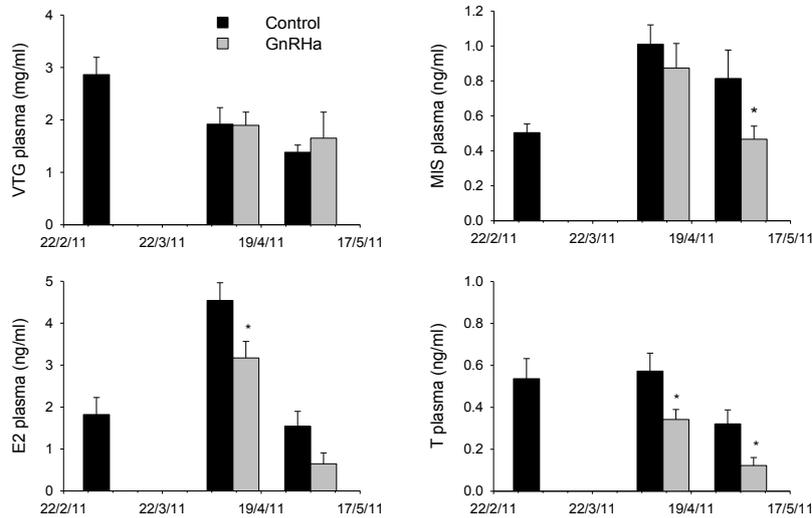


Figura 7. Niveles plasmáticos de vitelogenina (VTG), estradiol (E2), testosterona (T) y 17,20P (MIS) en hembras F1, control o tratadas con implantes GnRH α (administrados los días 7/3/11, 28/3/11 y 18/4/11). Los asteriscos indican diferencias significativas ($p < 0,05$) entre grupos para un punto de muestreo. Datos expresados como media \pm SEM ($n=9$).

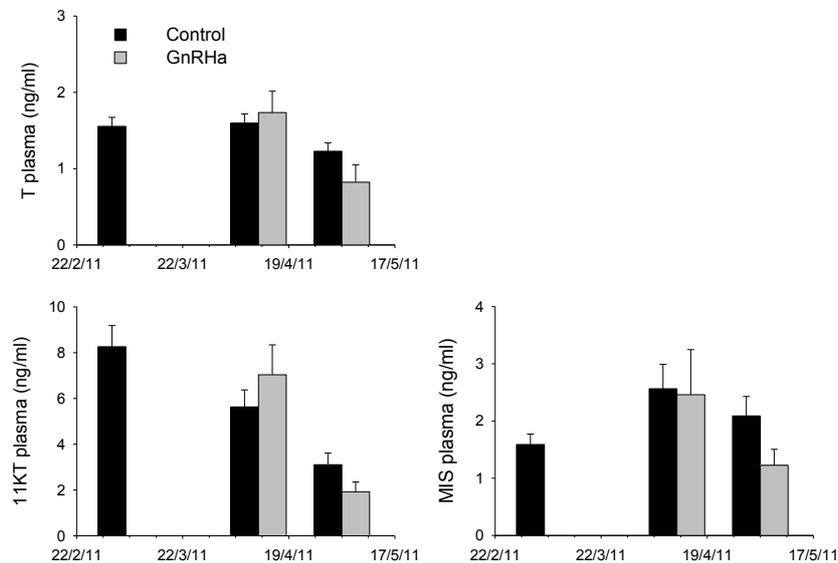


Figura 8. Niveles plasmáticos de testosterona (T), 11-ketotestosterona (11KT) y 17,20P (MIS) en machos F1, control o tratados con implantes GnRH α (administrados los días 7/3/11, 28/3/11 y 18/4/11). Datos expresados como media \pm SEM ($n=6$).

El análisis de biopsias ováricas obtenidas a día 0, y 2 semanas después del segundo y tercer implante, se muestra en la Figura 9. A día 0, el ovario contenía mayoritariamente oocitos en el rango de 400-600 micras, correspondiente a un estado de vitelogénesis avanzada. Dos semanas después de administrar el segundo implante, las hembras tratadas muestran abundancia de oocitos en maduración (600-650) y también lotes de oocitos hidratados (rango >1.000), indicativo de hembras que entran en período de ovulación y puesta. Sin embargo, las hembras control, a pesar de avanzar en el desarrollo a fases de maduración (rango 550 a 700), no presentan oocitos de gran tamaño, indicativo de hembras que no han alcanzado todavía fases de maduración final y ovulación.

El último punto de muestreo indica una distribución similar entre ambos grupos, pero con mayor abundancia de grandes tamaños en el grupo tratado y mayor abundancia de tamaños menores en el grupo control, indicativo de una mayor presencia de hembras en ovulación en el grupo tratado hormonalmente.

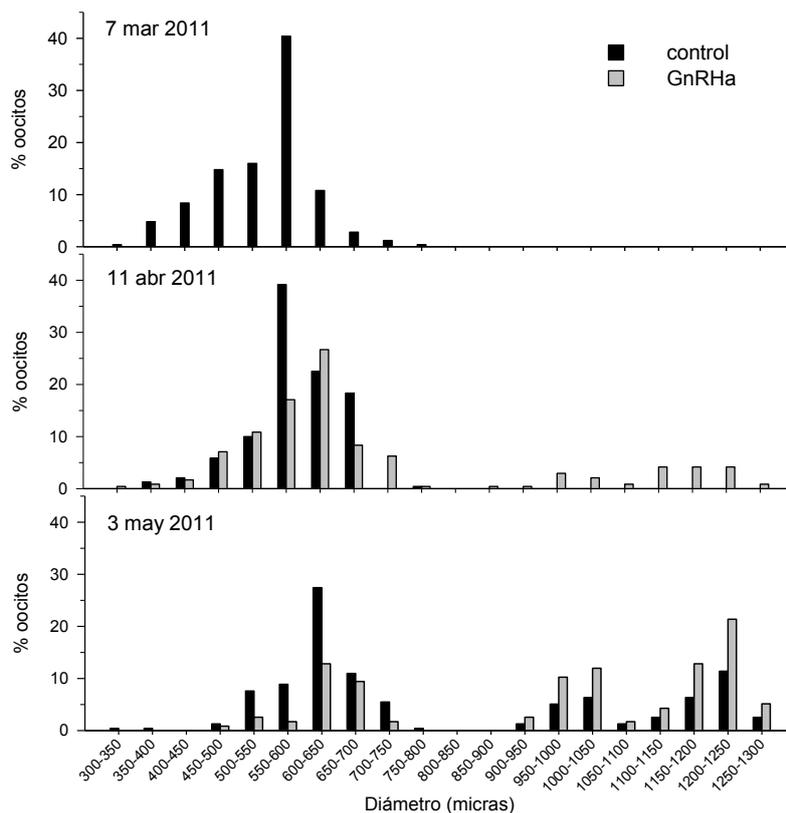


Figura 9. Análisis de biopsias ováricas obtenidas de las hembras F1 tratadas con salino (control) o implantes GnRHa. Se administraron 3 implantes GnRHa (10 ug/kg) los días 7/3/11, 28/3/11 y 18/4/11. En cada uno de los tres puntos de muestreo se muestra el porcentaje de oocitos de cada rango de tallas (n=6 hembras).

Los datos de biopsias ovaricas se correlacionan con los el análisis de puesta de huevos (Figura 10, Tabla III). Los controles presentan, como es habitual, puestas escasas y esporádicas, mientras que los grupos tratados muestran puestas a partir del segundo y tercer implante GnRHa. El tratamiento

incrementa la fecundidad de las hembras, pero en todos los casos las puestas son no fecundadas.

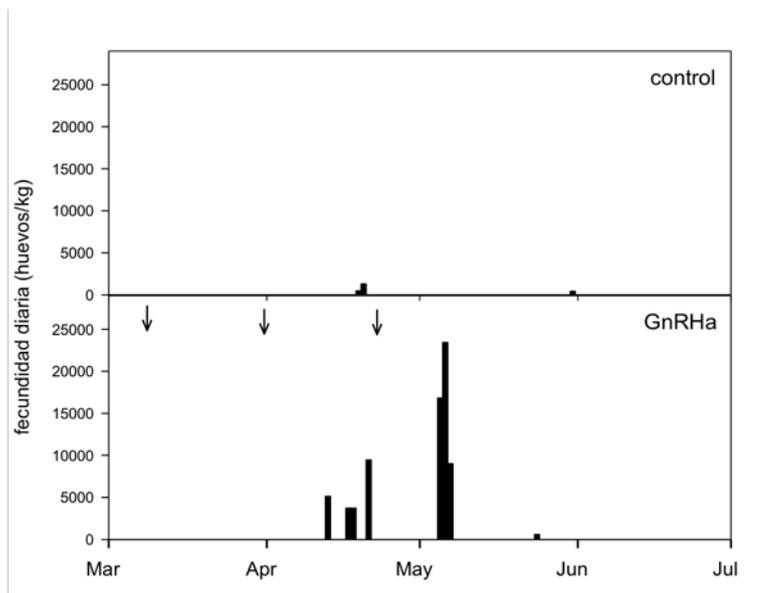


Fig. 10. Puesta de huevos en los grupos de reproductores F1 control o tratados con implantes GnRH_a (10 ug/kg). Las flechas indican el momento de administración de los implantes.

Tabla III. Datos de puesta en los tanques control o tratados con GnRH_a. Los grupos son duplicados y sólo un tanque se muestreó para sangre. Algunos parámetros se expresan como media ± SEM.

	GnRH _a	GnRH _a (muestreo)	Control	Control (muestreo)
	31	32	43	44
nº hembras/nº machos	9/6	7/6	13/8	13/8
Peso hembras (kg)	1,28±0,07	1,15±0,07	1,18±0,05	1,31±0,08
Peso machos (kg)	0,87±0,06	0,84±0,06	0,94±0,06	0,85±0,07
Nº de puestas	6	5	1	2
Fecundidad total (huevos/kg)	45.276	26.628	487	1.730
Fecundidad diaria (huevos/kg)	7.546±3.449	5.326±1.175	487	865±425
% flotabilidad	13,1±6,8	17,6±11,3	0,0	4,5±4,5
% eclosión	0	0	0	0

En conclusión, el tratamiento prolongado de reproductores F1 con implantes GnRH_a de dosis baja, aplicado desde fases tempranas del desarrollo gonadal (vitelogénesis), estimula la maduración oocitaria y ovulación en hembras, pero no produce un efecto significativo sobre la producción de esperma en machos y lo que es más importante, no consigue promover la fecundación de huevos en los grupos tratados.

Estudio de interacción entre sexos en función del origen salvaje o de cultivo sobre puestas naturales del lenguado en cautividad.

Ante la persistencia del fracaso en la reproducción natural en cautividad de lenguados procedentes de cultivo, se realizaron una serie de experimentos para comprobar si alguno de los dos sexos estaba más implicado en esta circunstancia. En marzo de 2010, comenzaron a obtenerse pequeñas puestas fecundadas de los stocks mixtos de reproductores mantenidos en el IEO de

Santander, las cuales continuaron hasta el mes de septiembre y siguieron al año siguiente. En la Tabla IV se muestran los resultados de la producción obtenida durante 2010 y 2011, donde solo el tanque A de hembras cultivadas y machos salvajes dio puestas fecundadas. El tanque B de hembras salvajes y machos cultivados originó una única puesta no fecundada de 40cc en el 2010 y dos con volúmenes de 20 y 30cc en el 2011. Se ha observado un incremento significativo en la media de la fecundidad relativa diaria y en la tasa de eclosión con el transcurso del tiempo. El estudio de paternidad de las larvas producidas en 2010 asigna el 40,45% a parejas únicas de reproductores, tres hembras F2 y tres machos salvajes. La hembra VI (origen F2) y el macho S5 era la pareja dominante responsable de la mayoría de las puestas con un porcentaje de participación de 58,33%. Otras parejas que contribuyen con menor porcentaje de participación como esa misma hembra dominante VI y el macho S8 con una participación de 11,1%, la hembra I (origen F2) con el mismo macho dominante S5 (16,67% participación), la hembra V (origen F2) con los machos 75 y con el S5 (11,11% y 2,78% participación, respectivamente). El resto de larvas (59,55%) fueron compatibles con más de una pareja.

Tabla IV. Producción total del stock A de hembras cultivadas F1 y F2 y machos salvajes de *Solea senegalensis* durante el 2010-2011.

AÑO	V. total (cc)	V. no flotante (cc)	% V.Flot.	RMFec	Nº puestas	Tasa Fecundación ± SE	Tasa Eclosión ±SE	Larvas
2010	3211	381	10,07	4,68±0,33 ^a	65	45,65±9,11	42,71±14,62 ^a	101.724
2011	4806	451	8,25	6,11±0,44 ^b	72	56,72±9,72	100 ^b	272.930

Los resultados de puesta a partir de los stocks mixtos estabulados en el IEO de Vigo coincidieron con los antes expuestos, tras la introducción de machos salvajes en tanques en los que había hembras, tanto de origen de cautividad (tanque T6) como salvajes (tanque T7). La distribución de puestas, así como la calidad de las mismas se indica en la Figura 11.

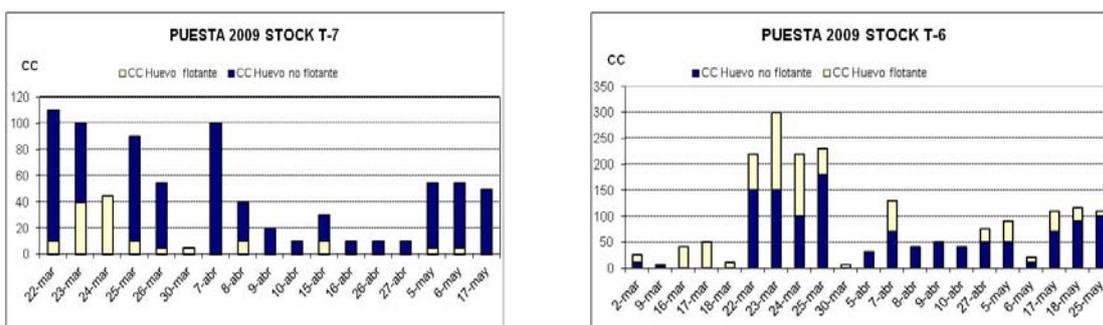


Figura 11. Distribución de puestas en tanques con combinación machos salvajes y F1, junto a hembras de origen F1 (T6) o salvaje (T7).

El número total de puestas fue de 38 (17 en el T-7 y 21 en el T-6), el volumen total de huevos fue de 2.710 cc, y el volumen de huevos viables (flotante) fue de 865.

Observación del comportamiento durante la puesta de lenguados F1 inducidos con las hormonas GnRH α y PGF2 α .

A través del estudio de actividad cuantitativa mediante sensores de movimiento, se determinó una bajada de actividad tras la manipulación (inyección de la hormona/salina). Los perfiles de actividad general se mantuvieron similares, con picos altos después de la entrega de alimento y una mayor actividad entre las 4 de la tarde y las 2 de la mañana.

A partir de la observación de los videos no se apreciaron comportamientos asociados a la reproducción, como formación de una pareja, el macho “molestando” a la hembra y protegiendo la hembra de otros machos, persecuciones entre machos y machos/hembra, natación de la hembra y el macho juntos hacia el superficie. Se determinó que no hubo comportamiento reproductivo asociado con las puestas recogidas durante el experimento. No hubo diferencia en la actividad entre los sexos fuera de lo indicado en el Etograma del lenguado (los machos presentan mayor actividad que las hembras especialmente en los periodos de madurez sexual).

Observación del comportamiento durante la puesta de lenguados F1 que desovan espontáneamente.

En las 5 puestas no fertilizadas que se obtuvieron a partir de los lenguados F1, no se observaron conductas reproductivas típicas de cortejo, como la subida sincronizada desde el fondo de los tanques hacia la superficie del macho y la hembra, culminando con la liberación de huevos. No hubo formación de una pareja o persecuciones entre machos y machos/hembra (Figura 12; persecuciones = Swim follow y Swim followed). En las noches que se produjo liberación de huevos no fertilizados, solo se detectó un incremento en el natación, pero no hubo comportamiento de natación siguiendo a otro lenguado (Swim follow), natación seguido por un lenguado (Swim followed), características de las persecuciones que se dan durante el cortejo.

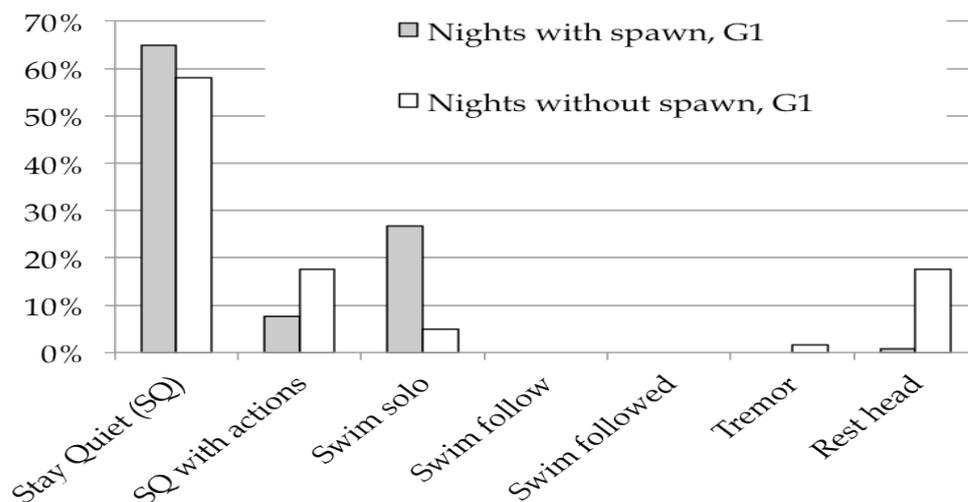


Figura 12. Porcentaje de diferentes comportamientos quieto (stay quiet), quieto con acciones de otro lenguado (SQ with actions), natación solo (Swim solo), natación siguiendo otro lenguado (Swim follow), natación seguido por un lenguado (Swim followed), temblor (tremor) y apoyar la cabeza en otro lenguado (Rest head) registrados a partir de un grupo de reproductores de lenguado senegalés (*Solea senegalensis*) durante un periodo de 30 minutos en cinco noches con puesta y cinco noches sin puesta.

Observación del comportamiento reproductor al combinar machos salvajes con hembras de origen F1 y F2 que presentan desove espontáneo.

Durante un mes de observación, se recogieron 5 puestas, dos puestas fecundadas y 3 puestas sin fecundación. A partir de la observación de los videos solo fue posible observar uno de los cortejos que resultó en una puesta fecundada. El comportamiento de la hembra F1 o F2 con un macho salvajes fue similar al cortejo observado en los grupos de lenguados salvajes. Después de un periodo de interacciones entre los lenguados la hembra empezó a nadar y el macho se puso debajo y nadaron sincronicamente hacia la superficie adonde liberaron los gametos. En comparación otro grupo de mezcla de origen, hembras salvajes con machos F1 no produjo ninguna puesta.

La disfunción reproductiva del lenguado senegalés de origen cautivo (F1) esta particularmente centrada en el macho, el cual no fue capaz cortejar correctamente con hembras salvajes. Por el contrario, hembras F1 o F2 sí fueron capaces de completar el cortejo con machos salvajes. La aplicación de las hormonas GnRHa y hCG y el PGF2a aumentó la frecuencia de liberación de huevos, pero no estimularon el comportamiento reproductivo, por lo que los huevos liberados no fueron fertilizados.

2.4.1.2. Resultados para el objetivo A.2. Desarrollar técnicas para conseguir la reproducción artificial.

Inducción hormonal de hembras para facilitar su desove mediante masaje abdominal (stripping).

La inducción hormonal a la ovulación con el fin de obtener huevos por masaje abdominal o stripping para la fecundación artificial era más efectiva con inyección que con implante (Tabla V). A lo largo de todo el experimento se obtuvieron 5.7 millones de huevos de las hembras del grupo IN, 1.3 millones huevos de las hembras del grupo IM y 0.3 millones de las hembras del grupo C. En todos los casos, la respuesta al tratamiento hormonal ocurrió a los dos días siguientes del mismo. En todas las hembras inyectadas se pudieron obtener huevos después de las dos primeras inyecciones. Después de la tercera inyección se obtuvieron huevos en cinco hembras y después de la cuarta inyección se obtuvieron huevos solo en dos hembras. No hubo diferencias en las tasas de fecundación y eclosión entre las puestas obtenidas mediante implante o mediante inyección.

Tabla V. Medias \pm SE del peso de las hembras, número de puestas por hembra y fecundidad relativa obtenida en cada tratamiento. Los datos en la columna con letra eran significativamente diferentes (IN= inyección, IM= implante, C= control).

Tratamiento	Peso (gr)	Nº puestas/♀	Fecundidad relativa nº huevos/Kg ♀ (x1000)
IN	1565 \pm 276	6.3 \pm 0.8a	574.9 \pm 67.2c
IM	1450 \pm 178	2.7 \pm 0.6b	134.6 \pm 40.9d
C	1470 \pm 260	0.8 \pm 0.5b	39.5 \pm 35.8d

Cuando se realizó el tratamiento hormonal a las 12 am mediante inyección y a 16°C, el 70% de las hembras hormonadas respondieron a las 41 y 44 horas, pero la hora de ovulación varió entre las 38 h y las 50 h post-tratamiento (Figura 13). Esta variación en el periodo de latencia puede ser debida al distinto grado de maduración de las hembras ya que el periodo de latencia de la hormona varía con la especie, la hormona utilizada, la dosis y la temperatura. Las mayores tasas de fecundación y eclosión de los huevos se obtuvieron en las 3 primeras horas tras la ovulación y después decrecían significativamente (Figura 14); observándose además divisiones irregulares a partir de las 6h postovulación en muchas de las FA realizadas. Entre las tasas de eclosión obtenidas a t=0 y t=+3h postovulación no se encontraron diferencias significativas, pero los datos obtenidos a t=0 eran menores debido tal vez a que en la primera presión abdominal realizada se arrastrasen ovocitos de peor calidad, bien de ovulaciones anteriores, o ovocitos todavía no maduros.

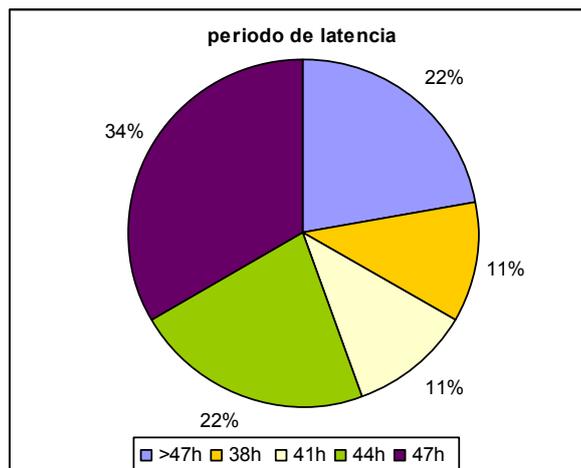


Figura 13. Tiempo de respuesta a la inducción hormonal de lenguado mediante inyección realizada a las 7 p.m. (E. maduración: E3; dosis: 25 µg / Kg; 16°C)

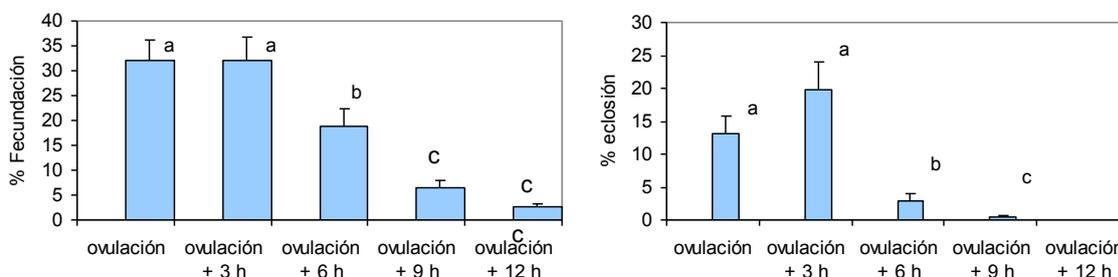


Figura 14. Evolución de las tasas de fecundación y de eclosión. Las letras distintas sobre las barras de error indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

Cuando se administró el tratamiento hormonal a diferentes horas del día se determinó que el periodo de latencia fue el mismo en los tres grupos y en la mayoría de las hembras se obtuvieron huevos a las 41 o 44 horas postratamiento, es decir que en lenguado senegalés el tiempo transcurrido entre la inyección hormonal y la ovulación es independiente de la hora del día en la que se suministra el tratamiento. Respecto a la calidad de los huevos obtenidos, no se encontraron diferencias significativas en la viabilidad aparente de los huevos entre los tres grupos, sin embargo en el Grupo 19 hubo cinco hembras cuya viabilidad fue cero, es decir los huevos estaban sobremadurados, frente a los grupos 6 y 12 que tuvieron una y ninguna respectivamente. Se encontraron diferencias significativas en las tasas de fecundación y eclosión, donde el Grupo 19 presentó tasas inferiores a los otros dos (Tabla VI). Estos resultados indicarían que la calidad del huevo obtenido por stripping sí estaría afectada por la hora de administración del tratamiento hormonal obteniéndose las peores tasas de fecundación y eclosión cuando se realiza por la tarde. En dorada la eficacia del tratamiento hormonal es mayor cuando se inyecta a las hembras a las 22:00 que a cualquier otra hora del día (Zohar 1988). Estos resultados podrían deberse a la existencia de ciclos circadianos en la sensibilidad de la pituitaria a la LHRHa o del ovario a la gonadotropina (Alvariño et al., 1992) por lo que sería interesante profundizar en el conocimiento de los ciclos diarios de los niveles hormonales en el lenguado senegalés y su variación en respuesta al tratamiento hormonal según la hora del día en la que se aplique el tratamiento.

Tabla VI. Resultados expresados como media \pm SE de las inducciones hormonales realizadas a las 6:00 horas (Grupo 6), 12:00 horas (Grupo 12) y 19:00 horas (Grupo 19). Las diferentes letras superíndice indican diferencias significativas.

	Grupo 6	Grupo 12	Grupo 19
Nº hembras tratadas	14	15	17
Peso medio (g)	1539 \pm 120	1278 \pm 120	1266 \pm 93
Edad (años)	4,8 \pm 0,5	5,4 \pm 0,3	5,3 \pm 0,3
Nº hembras con respuesta positiva	13	10	14
Periodo de latencia (horas)	43,1 \pm 0,6	43,4 \pm 1,1	41,4 \pm 1,4
Nº hembras fecundadas	13	9	13
Viabilidad aparente (%)	68,3 \pm 6,9	74,1 \pm 6,1	52,4 \pm 11,0
Tasa fecundación (%)	23,1 \pm 2,8 ^a	31,0 \pm 3,7 ^a	7,0 \pm 1,5 ^b
Tasa eclosión (%)	16,6 \pm 2,7 ^a	14,4 \pm 2,6 ^a	4,8 \pm 1,6 ^b

Cuando se utilizaron implantes para inducir la maduración gonadal, en el tanque control (N=6) una hembra alcanzó el estado de maduración E4 a los dos días de iniciar el experimento y se pudieron obtener huevos por masaje abdominal, pero eran de mala calidad. El resto de las hembras, dos meses más tarde no habían pasado aparentemente de estado E2. En el Tanque IM (N=6) cuatro hembras alcanzaron el estado E4 de maduración a los cuatro días de recibir el implante y se pudo extraer huevos por presión abdominal, las otras dos a los 21 días del primer implante estaban aún en estados de maduración E0 y E2 y se las colocó un segundo implante. La hembra que estaba en E2 respondió a los dos días mientras que la hembra que estaba en E0 se mantuvo en este estado. La calidad de los huevos obtenidos mediante implante fue mala ya que no se pudo predecir el momento de recogida o de realizar el *stripping*. Seis días después de obtener los primeros huevos mediante el implante se realizó una segunda inducción hormonal mediante inyección a las 12 a.m. y se obtuvieron huevos de todas las hembras a las 44 horas después del tratamiento. Tres de las cinco puestas se fecundaron con distintos pools de esperma crioconservado y se obtuvieron unas tasas de fecundación y de eclosión del 33,85 \pm 22,27 y 18,85 \pm 17,84, respectivamente.

La tabla VII refleja el porcentaje de hembras que responden a cada inyección hormonal con más de 10 x10³ huevos/Kg según el tratamiento aplicado en el experimento de inducción con cuatro inyecciones de GnRH α separadas con distintos intervalos de tiempo. El mayor nº huevos total/Kg. de hembra con el tratamiento B (493 \pm 76 x10³), seguido del C (328 \pm 56 x10³) y del A (216 \pm 32 x10³), habiendo diferencias significativas entre el tratamiento B y A. Las puestas obtenidas tras la primera inyección tuvieron un número de huevos/mL significativamente superior a las obtenidas en la segunda y sucesivas inyecciones, como se refleja en la Figura 15A. La Figura 15B muestra el número medio de huevos/Kg de hembra obtenidos después de cada inyección según el tratamiento aplicado, no encontrándose diferencias en las dos primeras inyecciones de los tres tratamientos. Sin embargo al comparar los tratamientos B y C, en los que hubo respuesta a las 4 inyecciones, se obtuvo una media de huevos por Kg de hembra y puesta significativamente superior en B que en C (123 \pm 12 y 82 \pm 13 x10³ respectivamente). Dentro del tratamiento B no hubo

diferencias entre las 4 inyecciones hormonales mientras que en C si existieron diferencias significativas entre la 2ª y 4ª inyección.

Tabla VII: Porcentaje de hembras que responden a cada inyección hormonal según el tratamiento (A= inyecciones días 0-7-22-29; B=0-7-37-44; C=0-15-30-45).

Tratamiento	1ª inyección	2ª inyección	3ª inyección	4ª inyección
A (N=6)	100%	83%	0%	0%
B (N=6)	100%	100%	83%	83%
C (N=5)	100%	80%	80%	60%

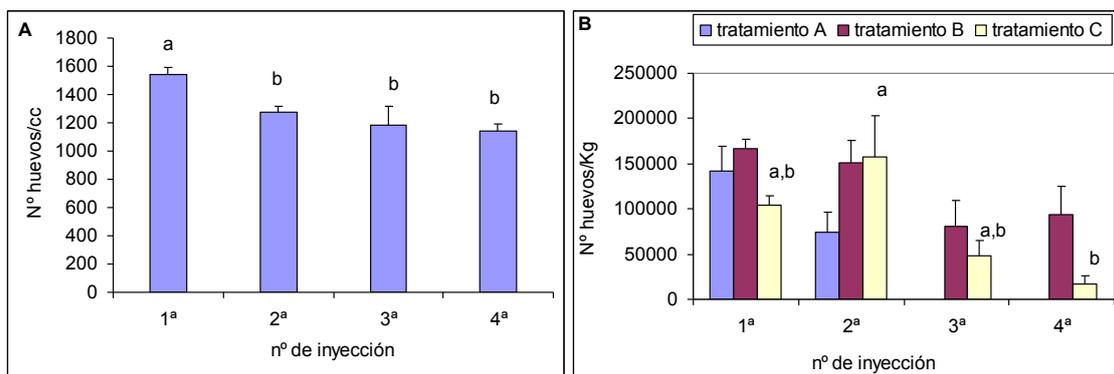


Figura 15: A. Número huevos por mL según el número de orden de la inyección hormonal. B. Número huevos/Kg. obtenidos en cada respuesta a la inyección hormonal según el tratamiento (A= inyecciones días 0-7-22-29; B=0-7-37-44; C=0-15-30-45)

La Tabla VIII muestra la tasa de fecundación, donde se observa que no había diferencias en las dos primeras inyecciones de los tres tratamientos. Dentro de cada tratamiento solo se encontraron diferencias significativas en el tratamiento C en el que la tasa de fecundación con la 2ª inyección fue superior a la de la 1ª pero no a la de la 4ª.

Tabla VIII: Tasas de fecundación de las FA de las puestas obtenidas después de cada inyección según el tratamientos (A= inyecciones días 0-7-22-29; B=0-7-37-44; C=0-15-30-45).

Tratamiento	Tasa fecundación (%)			
	1ª inyección	2ª inyección	3ª inyección	4ª inyección
A	37,7±5,26	45,4±10,16		
B	31,15±3,79	33,41±6,25	27,02±5,39	datos no incluidos
C	22,02±4,04 ^a	52,38±5,11 ^b	14,93±2,66 ^a	33,82±8,11 ^{a,b}

Al comparar espermatozoides salvajes y F1 no se encontraron diferencias significativas ni en la fecundación ($p = 0,335$) ni en la eclosión ($p = 0,628$), como se observa en la Figura 16.

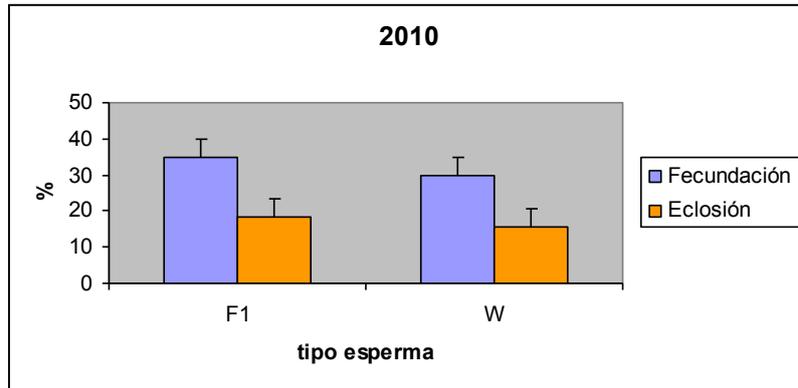


Figura 16. Tasas de fecundación y eclosión medias obtenidas en fecundaciones artificiales realizadas con espermia crioconservado de ejemplares salvajes o F1.

2.4.1.3. Resultados para el objetivo A.3. Establecer fuentes de variabilidad que afectan a la reproducción de ejemplares de cultivo.

Respuesta de reproductores de lenguado mantenidos en cautividad en diferentes instalaciones.

Las características de las puestas naturales de lenguado suelen variar, dependiendo en muchas ocasiones de la naturaleza de las instalaciones en las que se estabulan. Por ello, se efectuó un seguimiento de las mismas en instalaciones diferentes. Por un lado, los resultados de reproductores salvajes mantenidos en las Instalaciones del IEO de Santander bajo condiciones naturales se indican en la Tabla VII. La fecundidad relativa media del tanque B2 fue algo menor que la de los otros dos tanques. En la primavera, la fecundidad relativa media del tanque B2 fue significativamente menor que la del B3. La fecundidad total anual fue mayor en el tanque B3 seguido del B2 y por último del B1 con valores de $497,1 \times 10^3$ huevos, 156×10^3 huevos y $76,5 \times 10^3$ huevos por Kg de hembra, respectivamente. En la Tabla X se muestra un descenso en la producción durante este año del lenguado cultivado F1, con diferente alimentación.

Tabla IX. Número de puestas, media \pm SD de la fecundidad relativa diaria (MRFec) y porcentaje de la fecundidad total anual (%AFec) por estación, y fecundidad total (Tot Fec) anual del stock salvaje de *Solea senegalensis* durante el año 2011. Las diferencias significativas se indican con letras.

Tanque	Año	Estación	Nº puestas	MRFec (10^3 huevos kg^{-1})	%AFec (10^3 huevos kg^{-1})	Tot Fec (10^3 huevos kg^{-1})
B1	2011	Primavera	2	$4,96 \pm 1,5$ a, b	12,98	76,46
		Verano	9	$7,39 \pm 6,84$	87,02	
		Otoño	0	0	0	
Total			11	$6,95 \pm 6,21$		
B2	2011	Primavera	21	$3,23 \pm 2,2$ b	43,27	156,82
		Verano	15	$4,02 \pm 2,95$	38,49	
		Otoño	6	$4,76 \pm 3,33$	18,24	
Total			42	$3,73 \pm 2,64$		
B3	2011	Primavera	35	$7,19 \pm 4,81$ a	51,99	497,09
		Verano	33	$6,32 \pm 4,25$	40,58	
		Otoño	8	$4,62 \pm 3,8$	7,44	
Total			76	$6,54 \pm 4,5$		

Tabla X. Producción total del stock cultivado F1 de los tanques LP5 y LP6 alimentados con diferente tipo de dieta.

Tanque	2011	
	LP5	LP6
V. total	561	271
V. flotante	1	1
Nºpuestas	10	6
Larvas nacidas	0	0

Las tasas de fecundación y eclosión obtenidas se presentan en la Figura 17, donde se muestra que estos índices fueron significativamente menores con los ejemplares estabulados en el tanque B2; las tasas de fecundación y eclosión no presentaron diferencias significativas con las estaciones, aunque se observa un pequeño incremento con el paso de la primavera al verano y del verano al otoño. Además, se ha continuado tomando muestras de las larvas producidas para el estudio de paternidad que se realiza cada año.

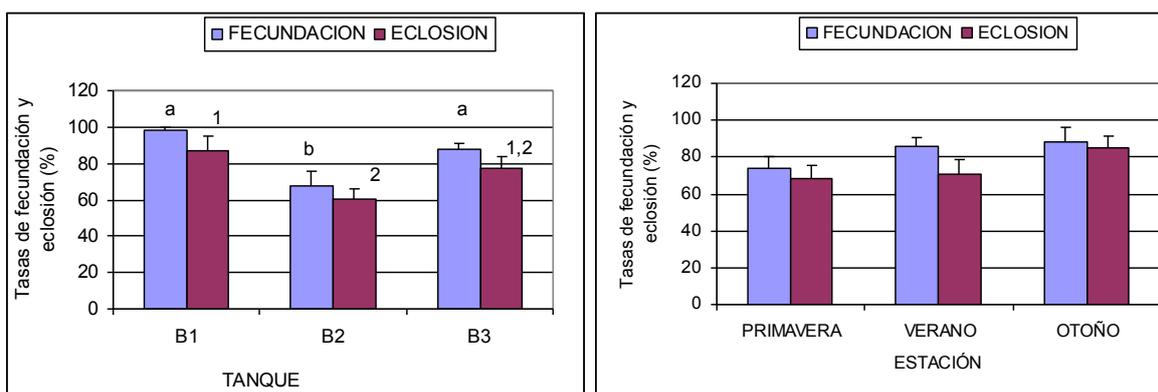


Figura 17. Tasas de fecundación y eclosión medias obtenidas durante 2011 por tanque y por estación. Los valores medios con letra o número diferentes eran significativamente diferentes.

En el IATS de Castellón se comenzó trabajando con un stock de ejemplares F1 nacidos en 2001. Mas tarde se crearon dos nuevos stocks, uno de individuos F1 y otro salvaje, procedentes del IEO-Santander e IRTA-Sant Carles de la Rapita, respectivamente. Todos los stocks se aclimataron perfectamente a las condiciones de cultivo del IATS, mostrando buenos signos de salud y crecimiento. En Castellón (40°N 0°E) y en condiciones naturales de fotoperiodo y temperatura, los reproductores de lenguado F1 presentaron un solo periodo anual de puesta de huevos, en primavera (Figura 18, Tabla XI). El porcentaje de flotabilidad de las puestas varió entre 0 y 50%, con un 0% de eclosión en todos los casos, indicando ausencia de fecundación en todas las puestas. En otoño se observó desarrollo gonadal evidente en las hembras de todos los lotes, pero en ningún caso se produjo liberación de huevos.

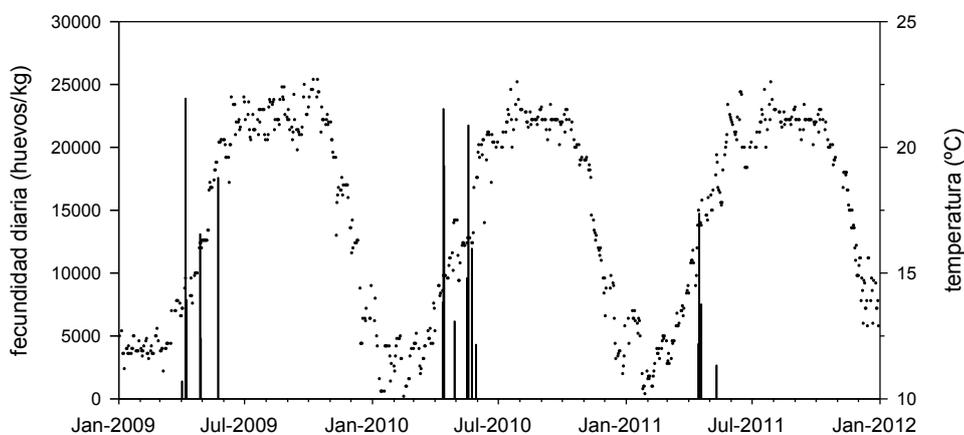


Fig. 18. Fecundidad diaria de los reproductores F1 (barras). Se muestra la fluctuación de temperatura del agua (línea discontinua) durante los 3 años.

Tabla XI. Características de la puesta de huevos de reproductores F1 (8-10 años edad) en IATS.

	2009	2010	2011
día primera puesta (temperatura)	2 abr (13,6°C)	13 abr (14,2°C)	19 abr (16,0°C)
día última puesta (temperatura)	24 may (20,0°C)	30 may (21,1°C)	11 may (20,1°C)
nº de puestas	7	10	5
fecundidad total (huevos/kg)	36.521	52.376	15.908
fecundidad diaria (huevos/kg)	11.693±1.744	10.305±2.705	5.275±2.852
fecundidad diaria máxima	17580 (24 may)	21.748(19-may)	14.742(16-abr)
% flotabilidad	6,7	13,2	17,8

En conclusión, la reproducción de lenguados F1 en estas instalaciones de la costa Mediterránea ha mostrado puesta de huevos espontánea, que se produce una vez al año en la época de primavera, con una duración de aproximadamente un mes y siempre con fecundidades bajas y siendo todas las puestas no fecundadas.

Los reproductores salvajes, de origen local, aclimatados y estabulados en las Instalaciones del IEO de Vigo, respondieron positivamente a la estimulación de temperatura, típica en diente de sierra, registrándose puestas naturales entre marzo y julio (Figura 19). El número total de puestas fue de 42, el volumen total de huevos fue de 7.205 cc, el volumen de huevo viable (flotante) fue de 3.050 cc y el volumen de huevo no viable fue de 4.155 cc.

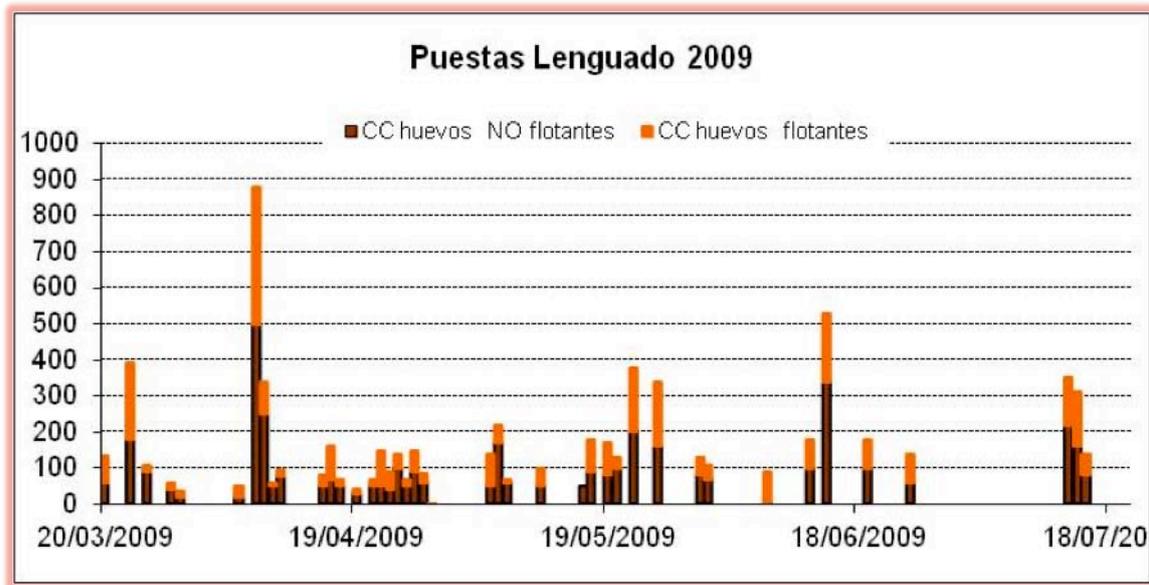


Figura 19: Distribución de puestas espontáneas de reproductores salvajes estabulados en el IEO de Vigo.

Efecto de la alimentación sobre la reproducción del lengado.

El efecto de una alimentación con alimento fresco natural frente al uso de un pienso compuesto comercial se estudió en dos grupos de reproductores F1. Un tercer grupo constituido por reproductores salvajes con alimentación natural, sirvió de control positivo. La alimentación no influyó en el volumen de esperma producido, pero la movilidad y densidad del esperma de los ejemplares salvajes fueron significativamente superiores a la de los peces F1 que recibieron dieta comercial ($p = 0,001$). Cuando se compara el esperma de los ejemplares salvajes y F1 alimentados con dieta natural se perciben movilidades significativamente superiores en los ejemplares salvajes. En la Figura 20 se han representado los valores medios mensuales de los parámetros de calidad del esperma evaluados.

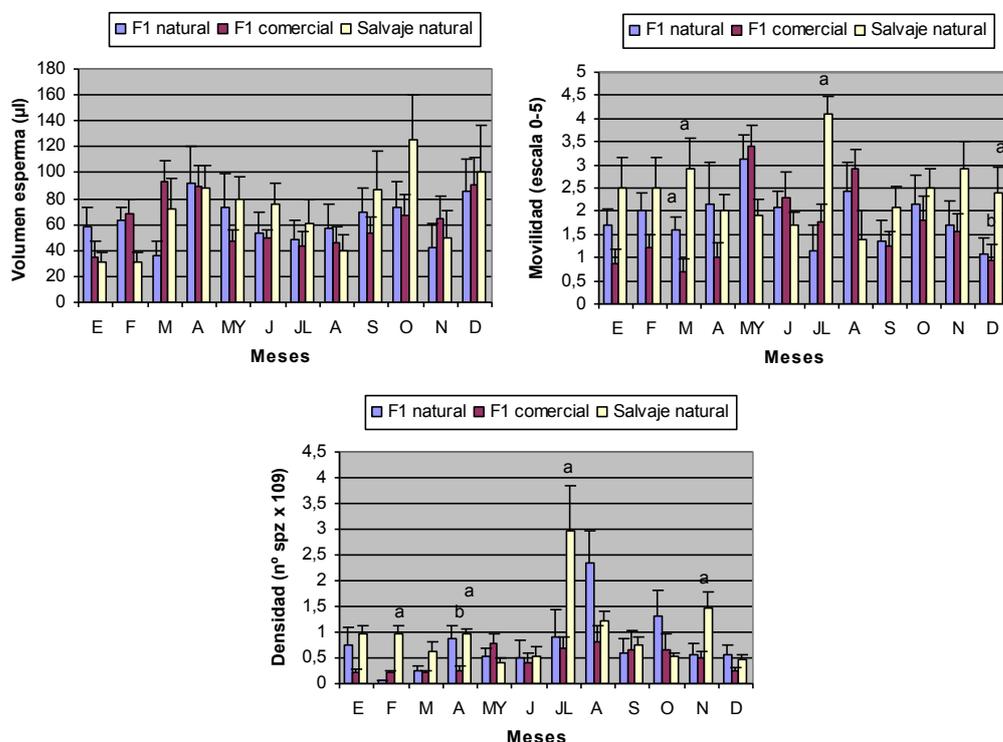


Figura 20. Valores medios mensuales del volumen, movilidad y densidad del esperma de ejemplares salvajes y F1. La F1 fue alimentada con alimento natural (tanque LP5) y dieta comercial (LP6). Los valores medios de movilidad y densidad con la letra a eran significativamente superiores.

Los resultados preliminares sobre la influencia de la alimentación en la calidad de los huevos (Tabla XII) apuntan a que se obtienen mejores viabilidades y tasas de fecundación y eclosión con las hembras con alimentación natural.

Tabla XII. Datos reproductivos obtenidos a partir de hembras alimentadas con diferente tipo de dieta y que reciben tratamiento hormonal.

Hembra	Peso hembra (gr)	Alimento	Nº huevos	% Viabilidad	Tasa Fecundación (%)	Tasa Eclosión (%)
65A-19BF	2245	NATURAL	514280	96	54,51±2,70	79,77±1,89
611-2B7A	1764	NATURAL	135520	83	57,20±1,00	52,48±4,07
659-EA66	1708	PIENSO	244440	40	4,37±0,26	7,64±1,33
639-27C2	1922	PIENSO	no responde			

A nivel de la influencia que la alimentación ejerce sobre los niveles de hormonas sexuales en el lenguado, se aprecia que los niveles plasmáticos de E2, el principal estrógeno de hembras, muestran en todos los grupos un perfil anual estrictamente correlacionado con el ciclo reproductor, aunque con ligeras diferencias entre grupos (Figura 21). En hembras F1 con alimentación natural, se observa el incremento de E2 inicial hasta niveles máximos en Abril, coincidiendo con el final de la fase de gametogenesis e inicio de maduración final de la gónada.

Los niveles descienden progresivamente durante la época de puesta, hasta el final de la misma (Julio), se recuperan ligeramente durante la post-puesta y se alcanza el mínimo a final de verano (Octubre), momento en que los niveles de E2 remontan de nuevo para un nuevo ciclo reproductor. El perfil anual de E2 en las hembras F1 alimentadas con pienso es muy similar, pero destacan niveles más bajos de E2 en el pico de gametogenesis (Abril). Esto indicaría una menor secreción de E2 durante la gametogenesis en las hembras alimentadas con pienso, que podría reducir el grado de desarrollo gonadal en estas hembras con respecto a aquellas alimentadas de forma natural. En cuanto a las hembras salvajes (alimento natural), presentan un perfil de E2 muy similar a las F1 de alimentación natural, con niveles máximos de E2 en gametogenesis (Abril) de igual magnitud y superiores a las F1 alimentadas con pienso. El andrógeno T, también detectable en hembras aunque con un papel menos relevante que el E2 en la regulación de la reproducción de hembras, muestra en general perfiles anuales correlacionados con los de E2. Al igual que lo observado con el E2, en general parece que los niveles de T en hembras F1 de alimentación natural son superiores a los de hembras F1 alimentadas con pienso, sugiriendo de nuevo que la alimentación natural afecta positivamente la secreción hormonal con respecto a la alimentación con pienso.

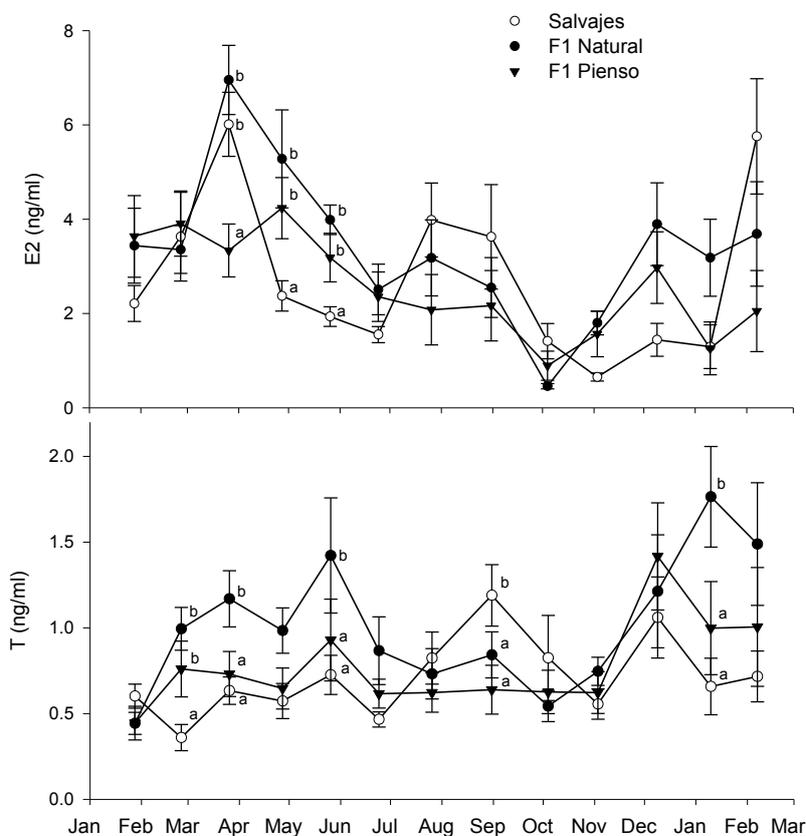


Figura 21. Niveles plasmáticos de estradiol (E2) y testosterona (T) en hembras del experimento de alimentación: natural versus pienso (Ene-2010 a Feb-2011). Cuando existen diferencias significativas ($p < 0,05$) entre grupos para un punto de muestreo, estas se indican con diferentes letras. Datos expresados como media \pm SEM ($n=7$).

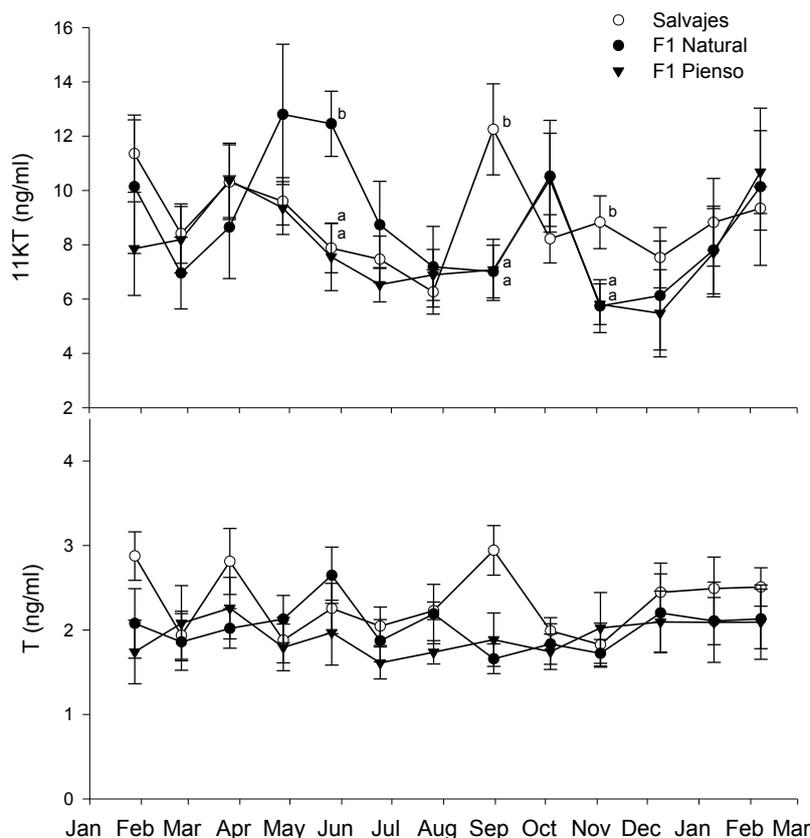


Fig. 22. Niveles plasmáticos de 11-ketotestosterona (11KT) y testosterona (T) en machos del experimento de alimentación: natural versus pienso (enero 2010-Febrero 2011). Cuando existen diferencias significativas ($p < 0,05$) entre grupos para un punto de muestreo, estas se indican con diferentes letras. Datos expresados como media \pm SEM ($n=7$).

En cuanto a machos, el análisis de los niveles plasmáticos de 11KT, el principal andrógeno en machos (11KT), muestra también perfiles anuales estrictamente correlacionados con el ciclo reproductor (Figura 22). En machos F1 con alimentación natural, se observa la elevación inicial progresiva hasta niveles máximos en Mayo, coincidiendo con la época de espermiación. A partir de ese momento, los niveles de 11KT descienden progresivamente hasta mínimos de post-puesta (Agosto) e inician de nuevo un incremento a final de año para el siguiente ciclo reproductor. Se observa un pico de 11KT en octubre, probablemente asociado a la ocurrencia de un segundo desarrollo gonadal en otoño, de menor magnitud que el principal de primavera y descrito previamente en esta especie. Los machos F1 alimentados con pienso siguen un perfil muy similar pero, al igual que lo observado en el caso de secreción de E2 en hembras, se observan niveles menores durante el pico de primavera (Abr-May), lo que indicaría que durante la espermatogénesis, la secreción hormonal en machos F1 alimentados con pienso es inferior a la de los alimentados de forma natural. Después del proceso reproductor de primavera, los perfiles de 11KT en ambos grupos de machos F1 es estrictamente similar hasta final de año. En cuanto a los machos salvajes, destaca el pico en niveles de 11KT a inicios de otoño (Sep), con

niveles elevados en Nov, lo que podría marcar una mayor actividad gonadal de los reproductores salvajes durante el periodo secundario reproductor de otoño, con respecto a reproductores F1.

En conclusión, el estudio comparativo entre reproductores F1 alimentados de forma diferente (natural frente a pienso) indica diferencias en la secreción de esteroides sexuales durante el desarrollo gonadal. Se hace patente una mayor secreción de E2 en hembras y de 11KT en machos durante la gametogénesis en reproductores F1 alimentados de forma natural con respecto a aquellos alimentados con pienso. Esto podría indicar un efecto negativo de la alimentación con pienso sobre el sistema endocrino que podría afectar al correcto desarrollo de los procesos de gametogénesis y maduración y así a la cantidad y calidad de gametos.

Determinación de niveles óptimos de ácido araquidónico (ARA) en la dieta de reproductores de lenguados F1.

Los diferentes niveles de ARA, 0,7(A); 1,6(B); 2,5(C); 3,4(D); 4,3(E); 5,2(F), en porcentaje (dieta) de los ácidos grasos totales influyeron sobre el crecimiento de los lenguados. Las dietas A y B produjeron las tasas de crecimiento más bajas (1,25), mientras que la dieta E se reflejó en las más alta (1,53). La tasa de crecimiento específico (SGR%) fue de 0,16% el día 1, con los valores más bajos en la dieta con F (0,14% día⁻¹). La SGR fue estadísticamente diferente entre hembras (0,20% día⁻¹) y machos (0,13% día⁻¹) ($p < 0,05$). Las hembras (0,23% día⁻¹) alimentadas con la dieta A y los machos (0,15% día⁻¹) alimentados con dietas A, B y C mostraron el mayor crecimiento y los machos alimentados con dietas D, E y F mostraron una reducción significativa de la SGR. Los peces no pusieron y no fueron inducidos.

El contenido de ARA en los tejidos varió de manera proporcional al de la dieta y los peces alimentados con dietas con altos niveles de ARA exhibieron altos niveles de ARA en sus tejidos. Además, los diferentes niveles de ARA en los tejidos fueron diferentes en cada tejido en comparación con los niveles observados en los peces salvajes (Figura 23). Los niveles de ARA en el ovario de los peces del grupo A fueron similares y no significativamente diferentes a los de los peces silvestres. Sin embargo, el contenido de ARA en el testículo, hígado y el músculo (hembra y macho) fue significativamente ($P < 0,05$) más bajo que el grupo salvaje. En los peces del grupo B, el contenido de ARA de ácido en los testículos, los ovarios y el hígado de las hembras fueron similares al grupo de salvajes, mientras que en el hígado de los machos y en el músculo de los machos y las hembras contenido de ARA fue significativamente ($P < 0,05$) inferior a en el grupo salvaje. El testículo, ovario y de hígado de lenguado procedente de los grupos C y D mostraron niveles similares de ARA que los del grupo de salvajes, y sólo el músculo mostró diferencias significativas ($P < 0,05$). Lenguados del grupo C y los machos del grupo D tuvieron los niveles significativamente ($P < 0,05$) más bajos en el músculo, mientras que los niveles en el músculo de las hembras en el grupo D no fueron significativamente diferentes de los lenguados silvestres. Los testículos y ovarios de los peces de los grupos E y F mostraron significativamente ($P < 0,05$)

mayor acumulación de ARA en comparación con el grupo salvaje. En el hígado y el músculo del grupo F, ARA fue similar al encontrado en los lenguados silvestres, lo mismo se encontró en el grupo E, excepto en el músculo de los machos, con los niveles de ARA significativamente ($P < 0,05$) más bajos que en el grupo salvaje.

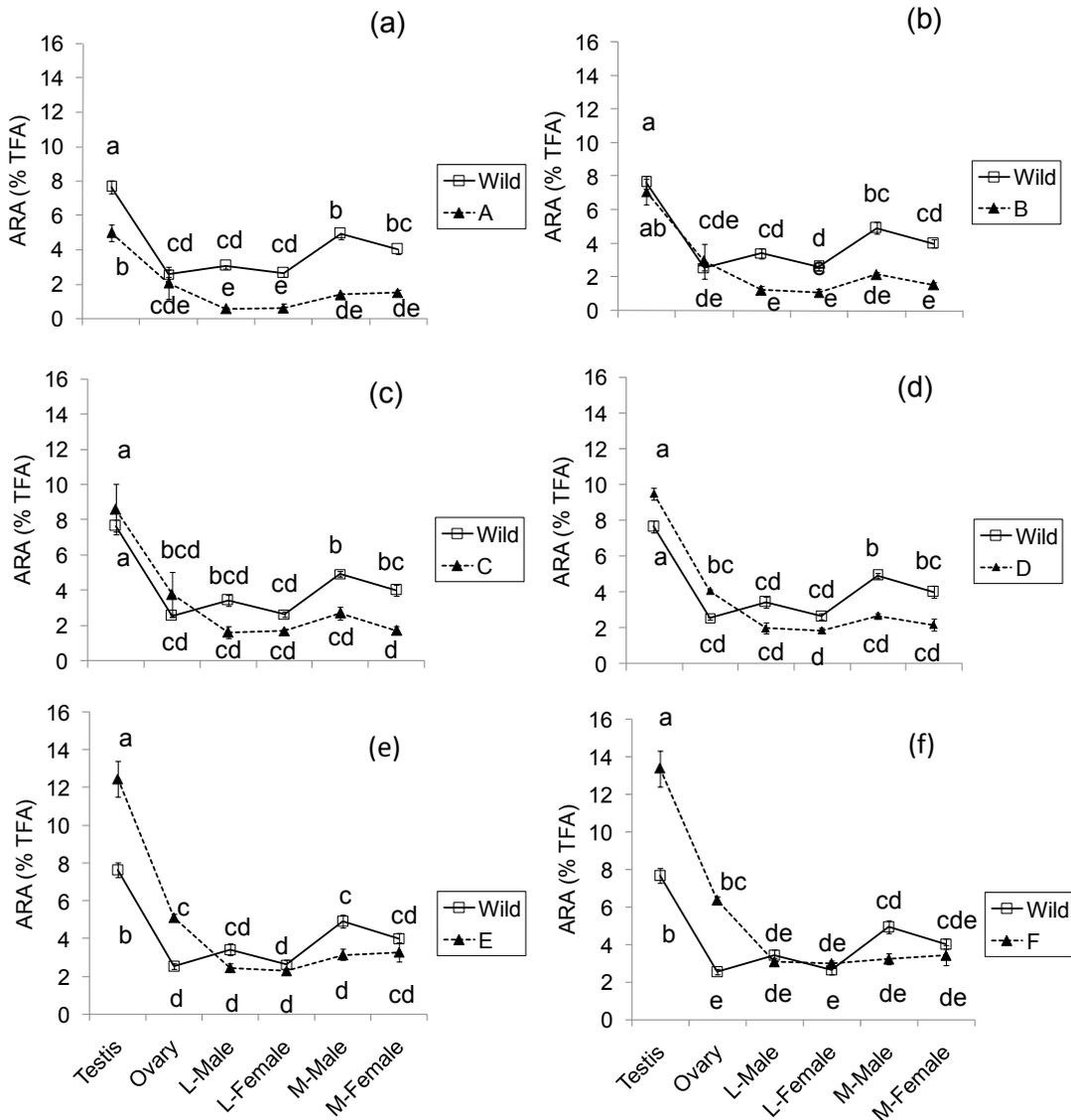


Figura 23. Contenido de ácido araquidónico, ARA (% total de ácidos grasos \pm SEM) en los tejidos, testículo (Testis), ovario (Ovary), hígado macho (L-Male), el hígado hembra (L-female), el músculo macho (M-male) y músculo hembra (M-female) de lenguados de cultivo (G1) utilizado en el experimento comparado a contenido en lenguados de medio salvaje (resultados de (JACUMAR PRODINLENG). Los lenguados de cultivo alimentados durante nueve meses con alimentados con diferentes niveles en la dieta de ARA ($n = 6$). a) peces alimentados con dieta A, 0,7% de ARA, b) los peces alimentados con dieta B, 1,6% de ARA c) los peces alimentados con las dieta C, 2,3% de ARA, d) los peces alimentados con dieta D, el 3,2% de ARA, e) los peces alimentados con dieta E, 5,0% ARA y f) peces alimentados con dieta F, 6,0% de ARA. Letras distintas indican diferencias significativas (ANOVA, $P < 0,05$, $n=6$) entre tejidos de peces silvestres y de cultivo.

De manera general, los lenguados de cultivo alimentados con dietas A y B (0.7 y 1.6% ARA) tuvieron niveles de ARA inferiores a los lenguados salvajes, los lenguados de cultivo alimentados con dietas C y D (2.3 y 3.2% ARA) tuvieron niveles similares comparado a los lenguados salvajes y los lenguados de cultivo alimentados con dietas E y F (5 y 6% ARA) tuvieron niveles más altos comparado a los lenguados salvajes. Del análisis de los tejidos parece que los niveles óptimos de ARA en la dieta son de 2.3-3.2% (dietas C y D) produciendo una composición nutricional más cercana a los lenguados salvajes.

Los niveles plasmáticos en machos de las hormonas sexuales, 11-ketotestosterona (11-KT) y testosterona (T), fueron significativamente ($P < 0,05$) afectados por la dieta en el mes de abril en el grupo E y F para el 11-KT (Figuras 24d y 24f) y D para T (Figura 24c). Aunque, en general, los niveles no fueron significativamente diferentes del grupo de control A, durante el mes febrero, marzo, abril y mayo, los peces alimentados con dietas D, E y F mostraron una mayor cantidad de los niveles de esteroides en el plasma. Los niveles plasmáticos en hembras de la hormona sexual estradiol (E2) fueron similares entre las diferentes dietas y sin diferencias significativas entre grupos. Las concentraciones plasmáticas de las tres hormonas 11-KT, T y E2, siguieron tendencias estacionales. En los machos, el primer aumento en los niveles de esteroides se detectó entre enero y febrero, con las concentraciones plasmáticas de andrógenos aumentando progresiva y significativamente ($P < 0.05$) con el pico más alto en abril. A continuación, los niveles de esteroides disminuyeron gradualmente hasta llegar a los valores iniciales mínimos en junio de 2010. En las hembras un incremento en los niveles de E2 se ha detectado entre enero y febrero, con concentraciones plasmáticas aumentando progresivamente después, hasta alcanzar un máximo en marzo y después disminuyó gradualmente hasta llegar a los valores iniciales en junio de 2010.

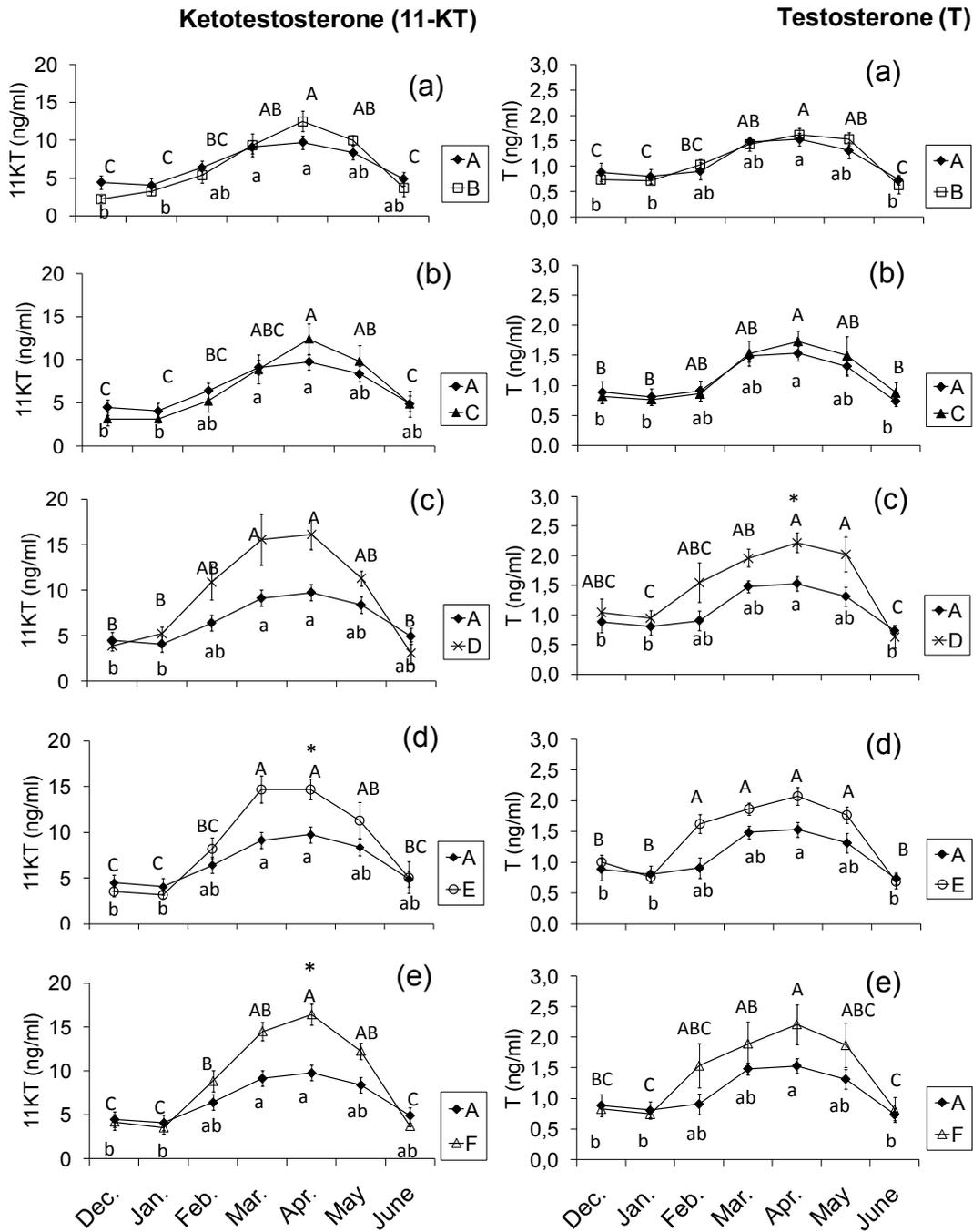


Figura 24. Cambios en los niveles plasmáticos de 11-ketotestosterona (11-KT) y testosterona (T) (media \pm SEM) en los machos de lenguados (*Solea senegalensis*) (n = 6) medidos en diciembre de 2009 (diciembre), enero (enero), febrero (febrero), marzo (marzo), abril (abril), mayo y junio de 2010 y alimentados con diferentes niveles en la dieta de ARA. a) Los peces alimentados con dietas A y B, b) los peces alimentados con dietas A y C, c) los peces alimentados con dietas A y D, d) los peces alimentados con dietas A y E, e) peces alimentados con dietas A y F. Letras distintas indican diferencias significativas (ANOVA, $P < 0,05$) entre los meses de muestreo y dentro de los tratamientos. Las letras pequeñas se utilizan para la dieta A (como control) y las letras mayúsculas para los tratamientos dietéticos B, C, D, E y F. (*) indican diferencias significativas ($P < 0,05$) con respecto al grupo A (control) y la dieta de la tratamiento. ARA en la dieta A=0,7 (control), B=1,6, C=2,3, D=3,2, E=5,0, H=6,0% de TFA.

La proporción de ARA en la dieta afectó a la expresión de genes implicados en la síntesis de moléculas de señalización durante el proceso de reproducción, como fueron Delta6-desaturasa (DESD6) elongasa (ELOVL5) y cyclooxygenasa (COX2). Los peces salvajes mostraron valores de ARA significativamente más alto que los peces cultivados. En testículos de peces salvajes se observó un 7.8% de ARA, lo que significa valores 5 veces más que en los peces cultivados. Una situación similar se observó en el hígado. Consecuentemente, se observaron diferencias significativas en el equilibrio eicosapentaenoico/araquidónico (EPA/ARA). La expresión transcripcional de COX2 en *Solea senegalensis* se produjo principalmente en branquias, testículos y oviducto. A través de Q-PCR se observó que en riñón de machos cultivados la expresión COX2 fue 13-veces mas baja que la expresión en la contraparte salvaje. Una tendencia similar en la expresión se observó en branquias y espermiducto con valores 5,8 y 5,7 veces por debajo de los salvajes (Figura 25).

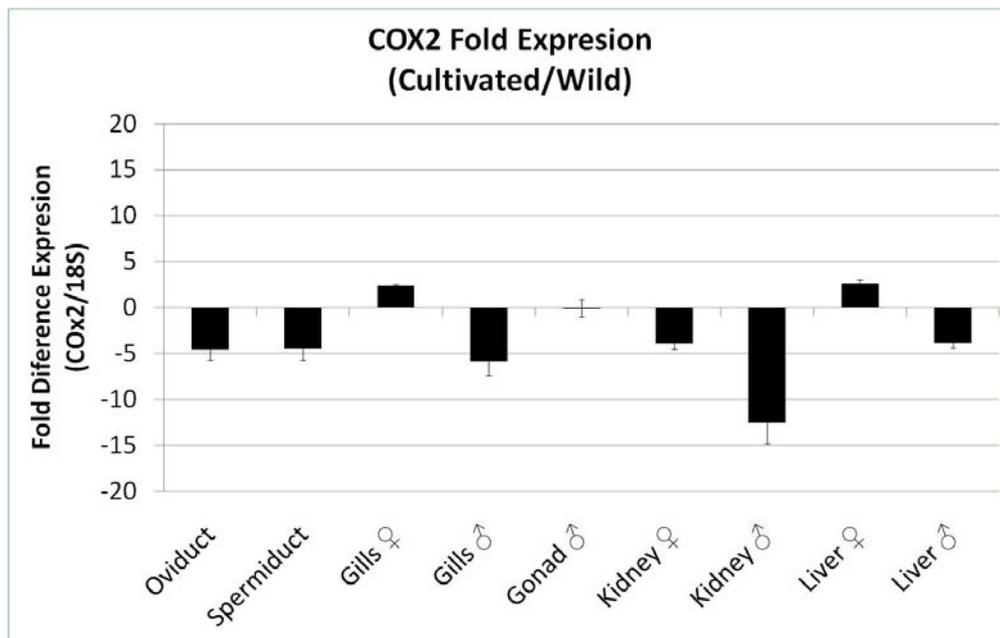


Figura 25. Expresión génica (Q-PCR) de COX2 (veces de expresión) en tejidos de peces cultivados el función de la contraparte salvaje (cultivate/ wild) de *Solea senegalensis*

Los resultados obtenidos en el experimento dosis respuesta de ARA, mostraron que la expresión de los transcritos de cyclooxygenasa en hígado de lenguado presentan una regulación diferencial nutricional (Figura 26), al igual que los genes asociados con la capacidad para desaturar y elongar como son el D6DES y ELOVL5, respectivamente. Los niveles de expresión de los transcritos D6DES y ELOL5 fueron significativamente más altos en hígados de peces alimentados con una dieta alta en ARA (C y F) comparado con el grupo control bajo en ARA (A), observándose una expresión de D6DES y ELOL5 de 6.8 y 5.3 - veces más alta en la dieta F con respecto a la dieta A ($p < 0.05$) (Figuras 27 y 28).

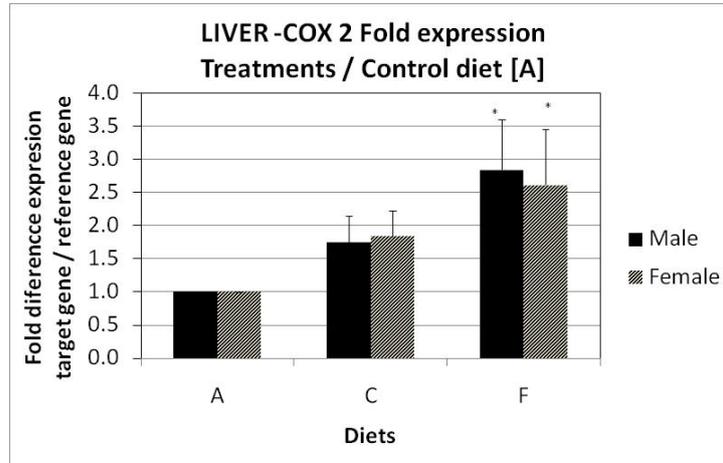


Figura 26. Cambios en expresión de COX2 en hígados de machos y embas de Solea senegalensis en respuesta a cambios dietéticos en contenido de ARA (dietas A, C y F). * indica diferencias significativas ($p < 0.05$) con respecto a la expresión en dieta A

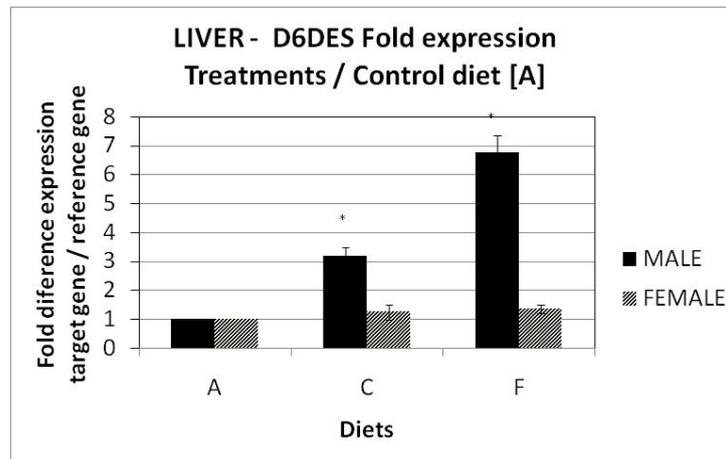


Figura 27. Cambios en expresión de D6DES en hígado de machos y hembras de Solea senegalensis en respuesta a los cambios dietéticos de ARA (Dietas A, C y E). * indica diferencias significativas ($p < 0.05$) con respecto a la expresión en dieta A

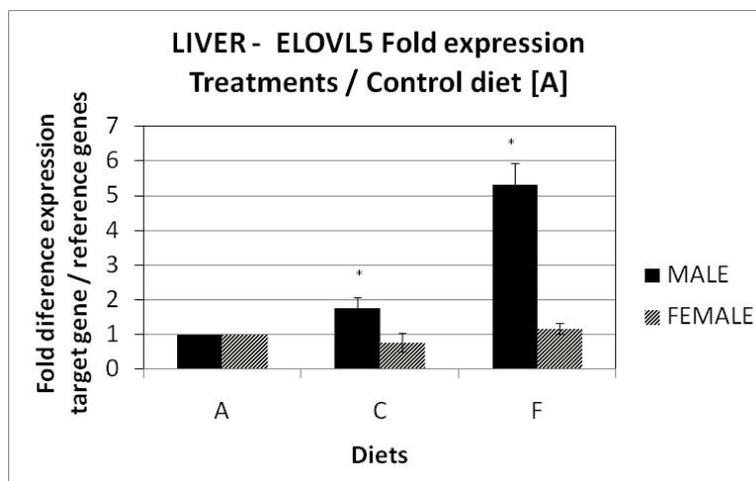


Figura 28. Cambios en expresión de ELOVL5 en hígado de machos y hembras Solea senegalensis en respuesta a los cambios dietéticos de ARA (Dietas A, C y E). * indica diferencias significativas ($p < 0.05$) con respecto a la expresión en dieta A

Estas diferencias en expresión fueron observadas en machos, en tanto las hembras no mostraron cambios en la expresión de estos genes. Sin embargo en ciclooxigenasa la regulación nutricional de su expresión presentó la misma tendencia en machos y hembras en respuesta al contenido dietético de ARA en las dietas, siendo significativamente más alta en los peces alimentados con la dieta F ($p < 0.05$) (Figura 26). Estos resultados indican que los ejemplares salvajes de *Solea senegalensis* acumulan ARA en hígado, testículo y ovario. Cuando estos ácidos grasos están presentes a ciertos niveles de acumulación los tejidos pueden ser desaturados a 22:4n-6 y elongados a 22:5n-6. Sin embargo, esta regulación diferencial presentada frente a cambios dietéticos en ARA se presenta solo en el caso de los machos. El incremento dietético en ARA también produce cambios en la expresión de ciclooxigenasa que a su vez se expresa más en los peces salvajes que en los cultivados.

Selección de dietas con distinto nivel de ácido araquidónico (ARA) en reproductores de lenguado F1.

Para este estudio, se consiguió que los reproductores de lenguado aprendieron a operar un sistema de alimentación de auto demanda, algo que sucedió después de un periodo de cuatro meses de entrenamiento. Los peces tenían opción de elegir entre dos dietas comerciales, con dos niveles distintos de ARA. Una dieta A con alto nivel de ARA (5,2% de ácidos grasos totales) y otra B con bajo nivel de ARA (0,7% de ácidos grasos totales). Los peces demandaron $14 \pm 0.7 \text{ g dia}^{-1}$ (promedio \pm SD), aproximadamente el 0.15% de su peso corporal. Durante el periodo experimental los peces cambiaron su preferencia por las dietas estudiadas. Durante las quince primeras semanas del experimento (de septiembre a diciembre) los peces mostraron preferencia por la dieta alta en ARA (70% de preferencia), comparado con la dieta baja en ARA (30 %), demandando en promedio 3.9% de ARA en las dietas. Después de este periodo de quince semanas, en enero se observó un drástico cambio en preferencias, con alta demanda de la dieta baja en ARA (dieta A), sin embargo la preferencia por la dieta alta en ARA (dieta B) comenzó a incrementar gradualmente en el mes de febrero. El nivel de ARA seleccionado durante este periodo de febrero hasta julio fue de un 2.5% de ARA. Después de este periodo la preferencia por la dieta alta en ARA (B) incrementó consecuentemente con la reducción de la dieta baja en ARA (A), demandándose en promedio un 4% de ARA entre los meses de julio y noviembre. Después de esto en noviembre, la preferencia por la dieta alta en ARA fue drásticamente reducida una vez más. El nivel de ARA seleccionado durante todo el periodo experimental de diecisiete meses fue de un 3% de ARA en dieta (Figura 29).

Los reproductores de lenguado senegalés parecen cambiar sus requerimientos de ARA durante el año. Antes del periodo reproductivo (otoño/invierno), los peces prefirieron una dieta rica en ARA, mientras justo antes y durante la reproducción las preferencias nutricionales en ARA fueron reducidas, para luego mostrar un lento y gradual incremento en la selección de ARA hasta

alcanzar el máximo nivel de demanda el mes de septiembre (después del periodo reproductivo). Los niveles de ARA fueron 8,75% de total de ácidos grasos en los testículos, 3,92% en el ovario y en el hígado ARA fue 1,58% en machos 1,15% en las hembras. Los lenguados de experimento de auto-demanda no presentaron diferencias en comparación con niveles observados en lenguados salvajes.

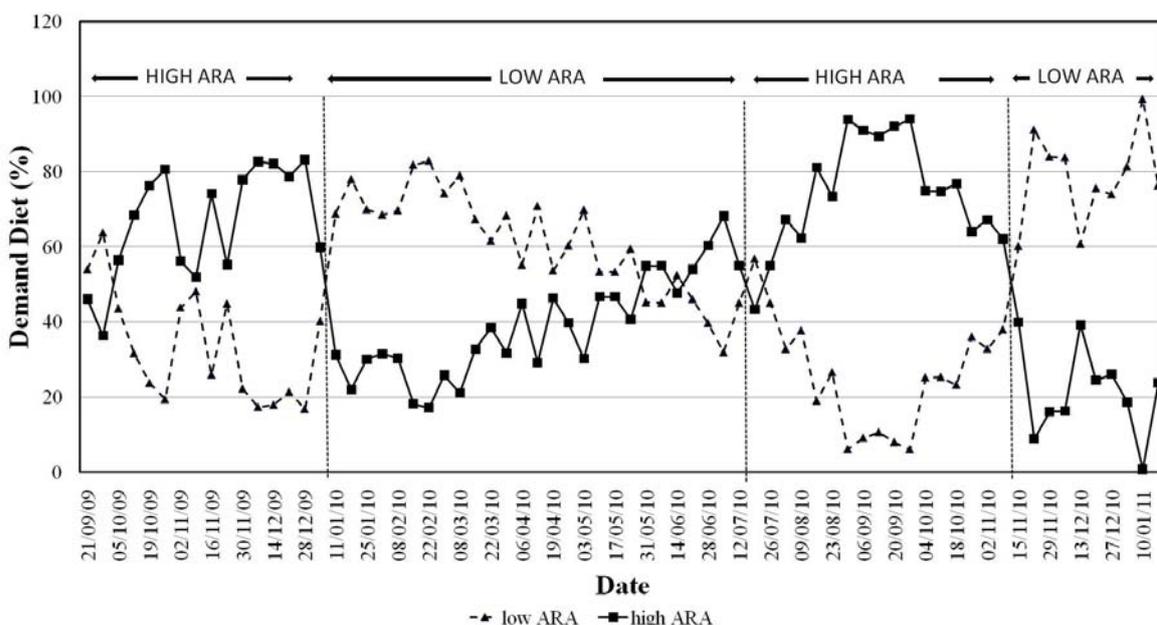


Figura 29. Selección semanal de dos dietas suministradas a reproductores de *Solea senegalensis*. Una dieta con alto porcentaje en contenido de ácido araquidónico (ARA) (5.2%) y otra dieta baja en ARA (0.7% del total de ácidos grasos). El experimento fue conducido durante diecisiete meses. Las líneas punteadas indican los periodos de alta y baja preferencia en ARA.

El nivel de ARA en la dieta afecta la composición nutricional y la fisiología reproductiva de los lenguados de cultivo (F1). Niveles de 2.3-3.2% ARA (TFA) en la dieta produjeron una composición nutricional y fisiología reproductiva parecido a los lenguados salvajes. En el experimento con alimentadores de demanda el nivel preferido de los lenguados fue de 3% y el contenido de ARA en los tejidos de los lenguados fue parecido a los lenguados salvajes. La literatura científica ha demostrado que una nutrición inadecuada y en particular deficiencias de ARA afecta la calidad y cantidad de huevos producido y es posible que parte del problema reproductivo del lenguado F1 esté relacionado a las dietas y en particular al contenido de ARA.

Efecto del fotoperíodo sobre la reproducción del lenguado.

Para estudiar la existencia de un ritmo endógeno de reproducción en el lenguado, se mantuvieron reproductores F1 bajo fotoperíodo natural (control) o en fotoperíodo constante (12Luz:12Oscuridad). El objetivo fue determinar si el ritmo de reproducción del lenguado persiste en ausencia de la señal lumínica del fotoperíodo y en su caso, si su periodicidad varía con respecto al ritmo de reproducción natural.

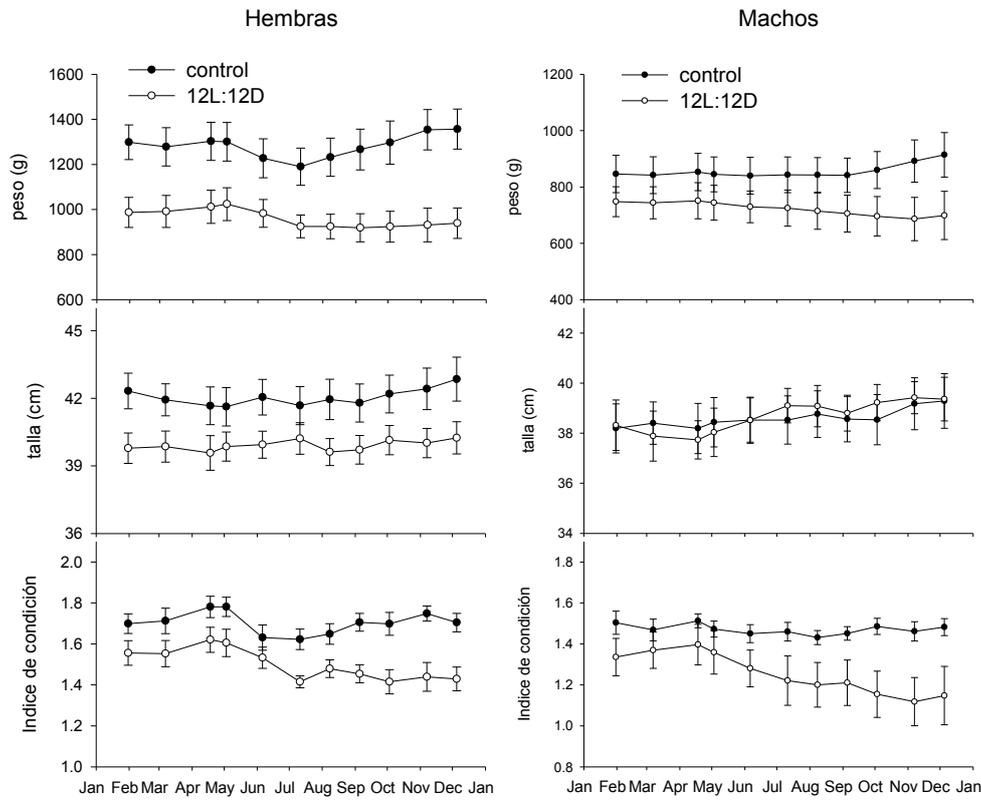


Fig. 30. Tasas de crecimiento en reproductores F1 mantenidos con fotoperiodo natural (control) o constante (12 h luz:12 h oscuridad (12L:12D) por día), desde septiembre 2010 hasta diciembre 2011.

La manipulación fotoperiódica se inició en Septiembre 2010 y a partir de febrero 2011 se muestrearon mensualmente los peces. El experimento se inició con unos peces ligeramente mayores en el grupo control que en el de fotoperiodo constante, pero ambos grupos mostraron similares tasas de crecimiento a lo largo del año. En ambos casos se observó descenso del peso durante la primavera, probablemente asociado al periodo reproductor (Figura 30). Ambos grupos produjeron puesta de huevos espontánea, aunque como es habitual en los reproductores F1, ésta fue en todos los casos no fecundada. La deposición de huevos se produjo en ambos grupos en la misma época y con fecundidades similares. Esto indica que la ausencia de señal fotoperiódica no inhibe la puesta de huevos y sugiere un papel predominante de la temperatura en la regulación de la puesta de huevos en lenguado.

Los análisis plasmáticos mostraron una evolución similar en la concentración de todos los parámetros, con picos de VTG y esteroides sexuales en primavera, coincidiendo con la época reproductiva. (Figura 31). Los niveles de VTG y T durante la gametogénesis (Feb-Abr) fueron superiores en controles que en los peces de fotoperiodo constante, lo que podría indicar un mayor grado de desarrollo vitelogénico en los peces control. Todos los parámetros plasmáticos muestran un descenso de niveles hacia el final de la época de puesta (Jun) y una

posterior recuperación de los mismos durante la post-puesta. Este perfil de VTG y esteroides sexuales es similar y coincidente en el tiempo en ambos grupos, indicando una sincronía en el desarrollo y por tanto, independencia de éstos respecto de la manipulación fotoperiodica.

En cuanto a los machos, se observa en general el perfil esperado de incremento de niveles de andrógenos (T y 11KT) durante la espermatogénesis (Feb-Abr), descenso de los mismos hacia el final de la época de puesta (Jun) y posterior recuperación en post-puesta (Figura 32). Aunque no se observan diferencias significativas ($p < 0,05$) entre ambos grupos en ningún punto de muestreo, se observa en general un ligero desplazamiento en los perfiles de T y 11KT del grupo de fotoperiodo constante con respecto a controles, lo que podría sugerir un retraso o menor grado de desarrollo de la espermatogénesis en los peces sometidos a fotoperiodo constante.

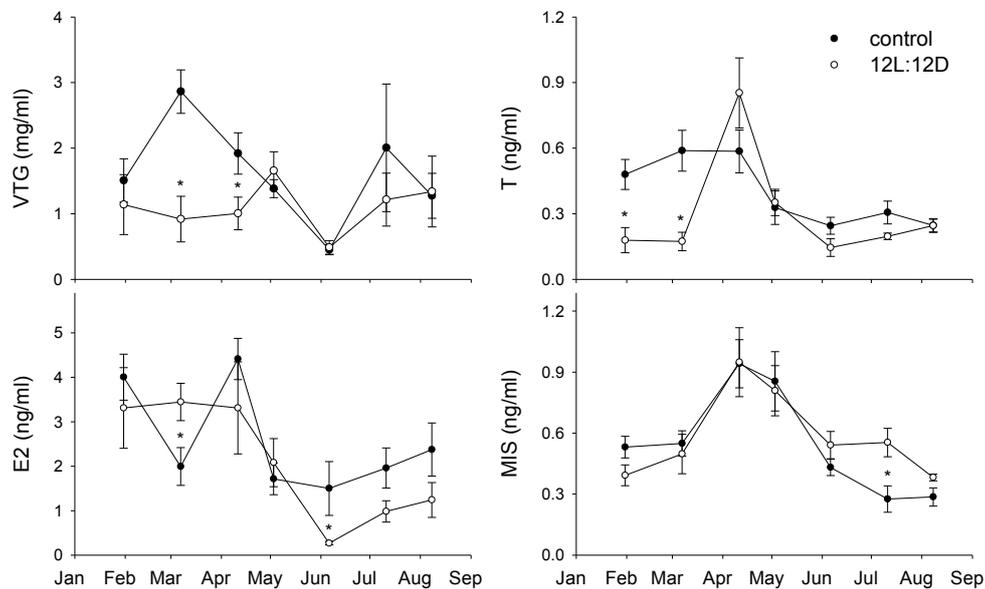


Fig. 31. Niveles plasmáticos de vitelogenina (VTG), estradiol (E2), testosterona (T) y 17,20P (MIS) en hembras mantenidas en fotoperiodo natural (control) o constante (12L:12D). Asteriscos indican diferencias significativas ($p < 0,05$) entre grupos para un punto de muestreo. Datos expresados como media \pm SEM ($n=7$).

Los niveles del esteroide inductor de la maduración (MIS) muestran un perfil retrasado con respecto al de andrógenos, como corresponde a su papel predominante en las fases finales de maduración gonadal. El perfil anual del MIS es similar en ambos grupos, indicando que la manipulación fotoperiodica no afectó el ritmo de secreción de MIS en el tiempo. Sin embargo, al igual que lo observado en los andrógenos, los niveles de MIS en las primeras fases de desarrollo son menores en el grupo constante que en controles, lo que sugeriría un menor grado de desarrollo testicular.

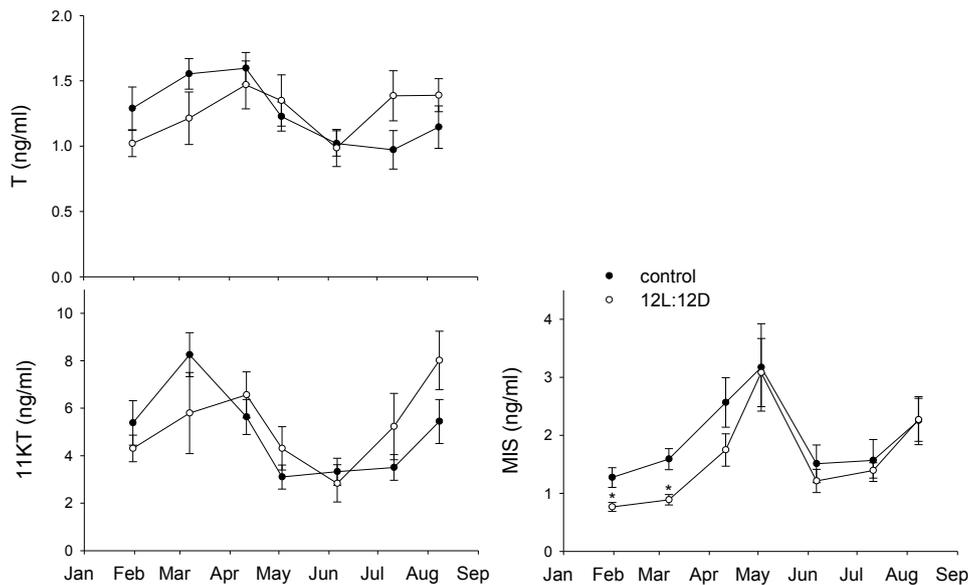


Fig. 32. Niveles plasmáticos de esteroides sexuales (testosterona (T), 11-ketotestosterona (11KT) y 17,20P (MIS)) en machos mantenidos en fotoperiodo natural (control) o constante (12L:12D). Asteriscos indican diferencias significativas ($p < 0,05$) entre grupos para un punto de muestreo. Datos expresados como media \pm SEM ($n=7$).

En conclusión, el estudio comparativo entre reproductores mantenidos en fotoperiodo natural (control) o fotoperiodo constante muestra que éstos últimos producen puesta de huevos espontánea en la misma época que los controles y con similares características de fecundidad. Esto sugiere la existencia de un ritmo endógeno de reproducción en el lenguado, que persiste en ausencia de la señal lumínica de fluctuación anual del fotoperiodo y apuntaría a un papel predominante de la temperatura en regular la puesta de huevos en esta especie. Los niveles sanguíneos de hormonas sexuales revelan, no obstante, diferencias entre grupos durante las primeras fases de desarrollo gonadal, con una secreción hormonal ligeramente inferior y retrasada en los peces de fotoperiodo constante con respecto a controles. Aparentemente esto no afectó al momento y características de puesta de huevos, aunque será necesario confirmarlo en los próximos ciclos anuales de reproducción de este lote de reproductores.

Influencia de la temperatura de incubación de los huevos sobre la proporción de sexos.

El tratamiento térmico (17, 20 o 22°C) de huevos recién fecundados, durante un periodo de 48 h, hasta su eclosión se llevó en las instalaciones del IFAPA Centro El Toruño. La mayor tasa de eclosión (82%) se observó cuando la temperatura de incubación fue de 20°C, similar a la utilizada habitualmente en el cultivo en cautividad de esta especie, y las menores cuando la temperatura de incubación fue de 17°C y 22°C, respectivamente (Tabla XIII). Los huevos incubados a 17°C sufrieron un retardo de 24 h en la eclosión respecto a los mantenidos con una temperatura de incubación de 20°C y 22°C.

Tabla XIII: Tasas de eclosión registradas para cada una de las temperaturas de incubación experimentales (22°C, 20°C y 17°C), expresada como media ± s.e.m.

Tª de Incubación		Tasa de Eclosión
°C		%
22 °C	22,02 ± 0,83	53,3 ± 17,6
20 °C	19,84 ± 0,62	82,05 ± 9,35
17 °C	16,49 ± 0,83	47,25 ± 14,15

Los valores registrados de peso seco fueron similares hasta el día 15 DDE, no dependiendo aparentemente de la temperatura de incubación ensayada (Figura 31). Sin embargo, a partir de producirse la metamorfosis y hasta el día 41 DDE el mayor crecimiento en peso seco se observa cuando la temperatura de incubación fue de 17°C, coincidiendo con las mayores longitudes totales registradas (Figura 21).

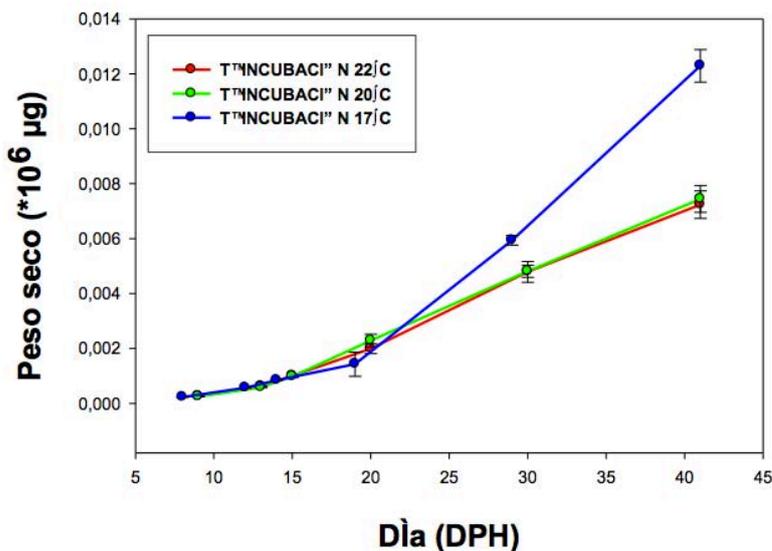


Figura 31. Evolución del peso seco (media ± s.e.m.) de *Solea senegalensis* hasta el día 41 después de la eclosión (DDE) en función de la temperatura de incubación.

El porcentaje de larvas que comenzaron la metamorfosis fue similar, 50% y 47,5 %, para las temperaturas de incubación de 22°C y 20°C, respectivamente. Sin embargo, se observó un retraso notable en la temperatura de incubación de 17°C con tan sólo el 9,1 % de larvas que iniciaron la metamorfosis. A pesar de ello, en las larvas procedentes de huevos incubados a la temperatura más baja (17°C) el periodo de metamorfosis se completó un día antes que aquellas procedentes de las otras temperaturas de incubación (22°C y 20°C).

Después de 166 días de cultivo, los alevines alcanzaron un tamaño suficiente para poder diferenciar la naturaleza de sus gónadas mediante micro disección y determinación visual de sexo mediante el empleo de una lupa binocular. Para las incubaciones realizadas en las temperaturas extremas se

aprecia un porcentaje de machos en torno al 60% (Figura 32), mientras que este valor se reduce al 50% cuando la temperatura de incubación fue de 20°C. La proporción de hembras es sensiblemente menor en todos los casos, particularmente para las temperaturas inferior y superior. La existencia de un porcentaje significativo de individuos en los que no se pudo determinar el sexo es consecuencia de la dificultad que entraña este tipo de determinación en peces tan pequeños. Ante la incertidumbre de la posible evolución sexual de los individuos indeterminados, no resulta posible extraer conclusiones claras acerca del efecto de la temperatura de incubación de huevos de lenguado sobre su posterior desarrollo sexual.

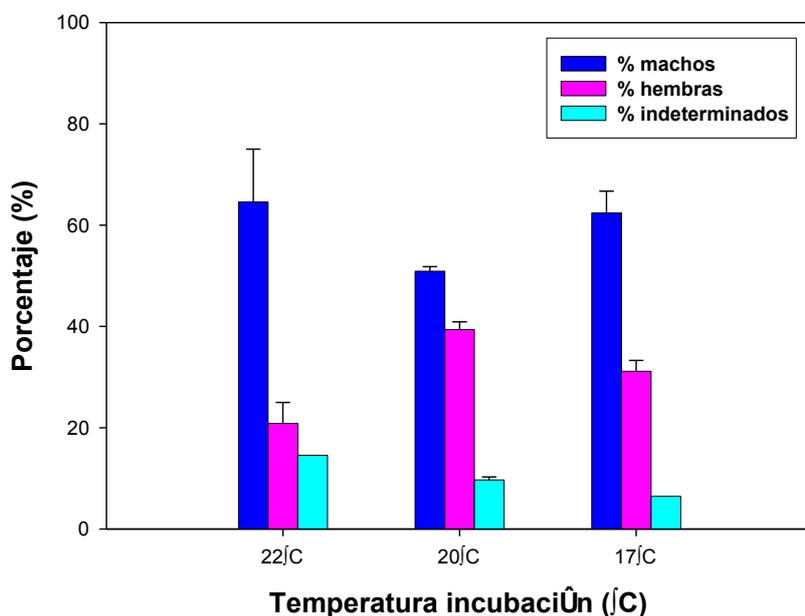


Figura 32: Porcentajes de sexos de *S. senegalensis* (166 DDE) observados macroscópicamente.

Influencia de la temperatura durante la metamorfosis sobre la proporción de sexos.

En esta ocasión, las puestas obtenidas en El Toruño fueron transportadas a las instalaciones industriales de la empresa CUPIMAR (San Fernando, Cádiz), donde se realizaron los cultivos larvario y de alevinaje, de acuerdo a protocolos ya establecidos. La única salvedad al protocolo fue la modificación de la temperatura del agua entre los días 8 y 20 de edad, afectando específicamente al periodo de la metamorfosis del lenguado. Después del tratamientos térmico (16°C y 20°C) durante la metamorfosis, cuando los lenguados alcanzaron una edad de cinco meses, se llevó a cabo un análisis micro anatómico de 800 alevines de lenguado, pudiéndose percibir bajo lupa binocular el sexo de la gónada (Figura 33)



Figura 33: Detalle de la micro disección y observación de gónadas en alevines de lenguado.

La disminución de la temperatura a 16°C durante la metamorfosis se tradujo en un importante descenso de la actividad metabólica del lenguado, tal y como se puede deducir a partir del escaso crecimiento registrado durante este periodo (Figura 34). La diferencia entre las dos temperaturas experimentales se percibe igualmente cuando se mide el índice metamórfico. Mientras que con una temperatura de 20°C la totalidad de la población efectuó la metamorfosis a los 17 días de edad, cuando este parámetro se disminuyó a 16°C, la población necesitó hasta el día 23 de edad para completar la metamorfosis (Figura 34). La importante diferencia de crecimiento durante este periodo de tiempo fue compensada con al final, una vez que la temperatura del agua en todos los tanques fue devuelta a su valor de 20°C (Figura 35).

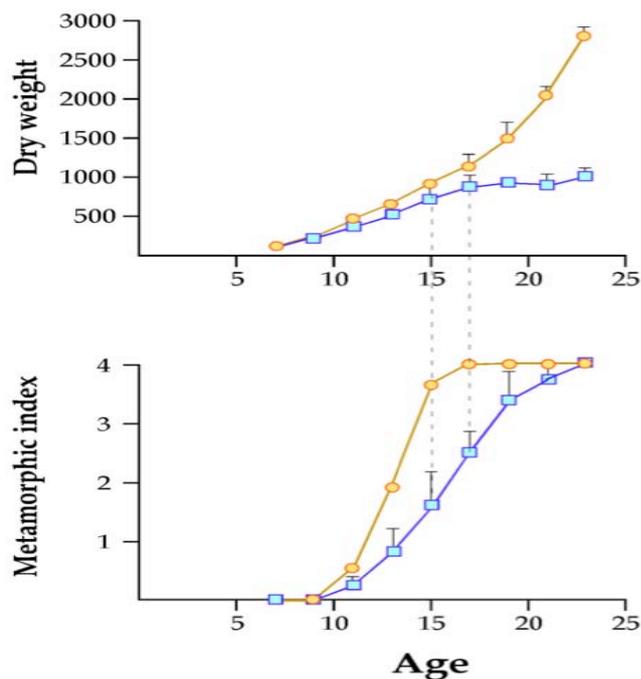


Figura 34: Crecimiento y evolución del índice de metamorfosis de larvas de *S. senegalensis* cultivadas a 16°C (celeste) y 20°C (naranja).

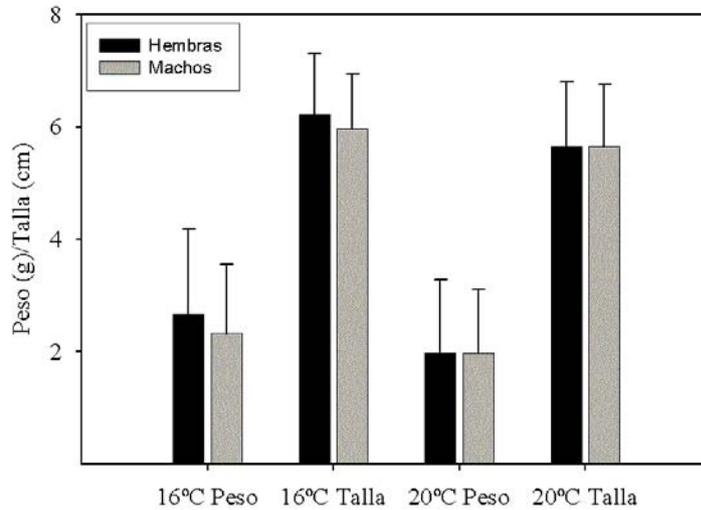


Figura 35: Peso (g) y talla (cm) de alevines de lenguado con cinco meses de edad, cuya metamorfosis se desarrolló 16°C o 20°C.

Estos resultados indican que exponer larvas de lenguado durante su metamorfosis a una temperatura del agua inferior (16°C) a la convencionalmente establecida en los protocolos de cultivo (20°C) no afecta al tamaño de los alevines obtenidos al final del proceso de su producción en criadero. Si embargo, la proporción de sexos si que se vio sensiblemente afectada por este tratamiento, ya que bajo las condiciones convencionales de temperatura (20°C) se registró un 62% de machos entre la población final, mientras que cuando la temperatura para la metamorfosis se redujo a 16°C, la proporción de machos pasó a ser del 46% (Figura 36). Se han generado evidencias de que las condiciones de temperatura establecidas en los protocolos de operación descritos hasta la fecha tienden a favorecer la presencia de machos. Resulta por lo tanto recomendable efectuar un mejor control de la temperatura en etapas tempranas del desarrollo del lenguado, que redunden en la mayor proporción posible de hembras, dado el mayor crecimiento de estas durante preengorde y engorde.

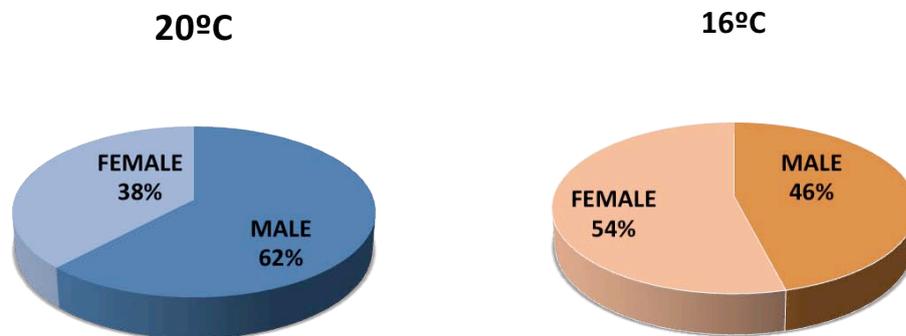


Figura 36: Proporción de sexos en alevines de *S. senegalensis* cuya metamorfosis se realizó bajo 16°C y 20°C.

2.4.2. RESULTADOS RELACIONADOS CON EL OBJETIVO B. Determinar condiciones de cultivo para una óptima respuesta inmune y resistencia a patógenos en juveniles.

2.4.2.1. Resultados para el objetivo B.1. Establecer niveles de referencia para evaluar la respuesta inmune.

Conocimiento del sistema inmune del lenguado.

Los niveles de referencia para evaluar la respuesta inmune se llevaron a cabo mediante:

1) *Desarrollo de ensayos de estimulación inmune y validación.* En el tratamiento con LPS y poli I:C, los resultados de expresión confirmaron que los estímulos utilizados eran capaces de activar la expresión de los tres genes ensayados en riñón a distintos tiempos y en función del estímulo utilizado (Figura 37). La *hamp1* y la lisozima G respondieron tanto a LPS como poli I:C. En el caso de la *hamp1*, los valores de expresión aumentaron significativamente después de la inyección con LPS (115-, 175- y 23- veces a las 3, 8 y 24 h, respectivamente) y poli I:C (25-, y 21-veces a las 8 y 24 h, respectivamente). Para la lisozima G, la respuesta fue más tardía observando un incremento de los niveles de transcrito frente a poli I:C a 8 y 24h (28-, y 7-veces a las 8 y 24 h, respectivamente) y frente a LPS a las 24 horas (8 veces mayor que el control). Por el contrario, C3 sólo respondió frente LPS a las 8 y 24 h (5,3- y 4,5-veces a las 8 y 24 h, respectivamente).

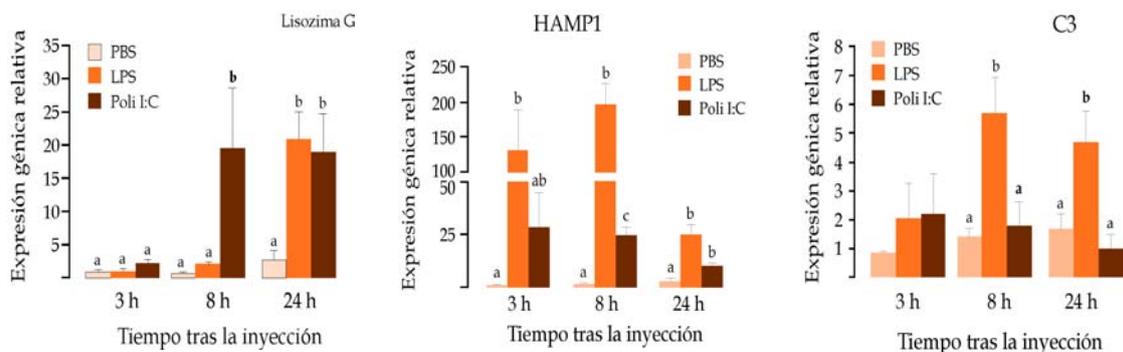


Figura 37: Expresión de lisozima G, *hamp1* y C3 en riñón cefálico tras la inyección de LPS y Poli I:C. Como calibrador se usó la muestra PBS 0 h. Valores con diferente letra son estadísticamente significativos.

La estimulación mediante inyección con LPT (0,14 mg/100µl), PGN (0,3 mg/100µl ~10 mg/Kg) y zymosan A (1,2 mg/100µl ~40 mg/Kg) produjo resultados similares. La lisozima g aumentó su expresión significativamente tras la inoculación con LTA (2,3 y 5,8 veces a 8 y 24 h, respectivamente). En cambio, no se observaron diferencias significativas tras la inyección de PGN y ZYM (Figura 38). Por el contrario, la *hamp1* aumentó sus niveles de ARNm significativamente tras la inyección con ZYM (19,6 y 10,7 veces a 8 y 24 h, respectivamente) y PGN (20,5 veces a 8 h). En el caso de C3, los niveles de expresión aumentaron

significativamente 24 h tras la inyección de LTA y PGN (11,7 y 5,5 veces, respectivamente).

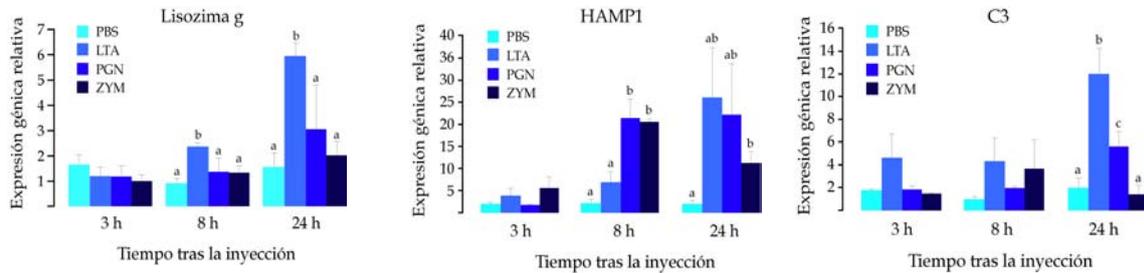


Figura 38: Expresión de lisozima g, *hamp1* y C3 en riñón cefálico tras la inyección de LTA, PGN y ZYM. Como calibrador se usó la muestra PBS 0 h. Valores con diferente letra son estadísticamente significativos.

Finalmente, para estudiar si la respuesta de lisozima g, *hamp1* y C3 era comparable entre tejidos, se analizó la expresión de dichos genes en cerebro, bazo, branquias y timo 24 h tras de la inyección con LTA, PGN y ZYM. Los niveles de lisozima aumentaron significativamente a las 24 h tras la inyección con LTA y ZYM en bazo (5 y 3,5 veces, respectivamente) y tras la inyección con LTA (4,3 veces) en timo (Figura 39). En cerebro y branquias no se observaron ningún cambio significativo. En el caso de *hamp1*, los niveles de transcrito aumentaron significativamente en bazo 12,3 y 9,5 veces después de la inyección con LTA y ZYM, respectivamente (Figura 40). En branquias, los niveles de expresión de *hamp1* aumentaron tras las inyecciones con LTA (aunque no significativamente) y ZYM (12,5 veces). En cerebro y timo, la expresión de *hamp1* no cambió después de ningún tratamiento. En el caso de C3, los niveles de expresión aumentaron significativamente en bazo 3,8 veces tras la inoculación con PGN. Sin embargo, no se activó la expresión de C3 en cerebro, branquias y timo en ningún caso (Figura 41).

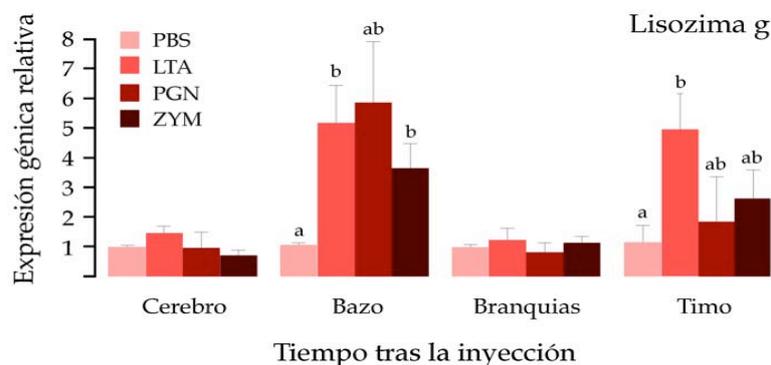


Figura 39: Expresión de lisozima g en tejidos 24 h tras la inyección de LTA, PGN y ZYM. Como calibrador se usó la muestra PBS 24 h. Valores con diferente letra son estadísticamente significativos.

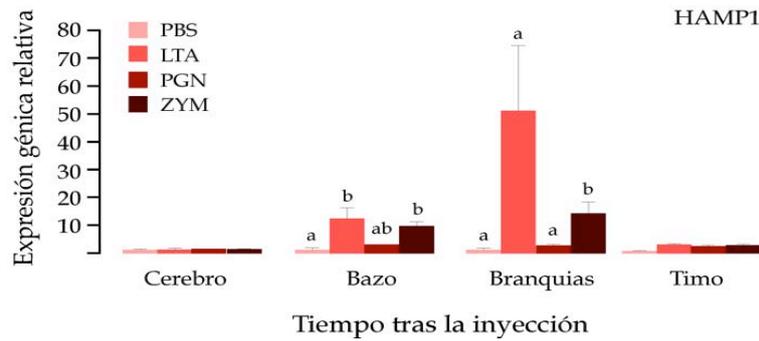


Figura 40: Expresión de *hamp1* en tejidos 24 h tras la inyección de LTA, PGN y ZYM. Como calibrador se usó la muestra PBS 24 h. Valores con diferente letra son estadísticamente significativos.

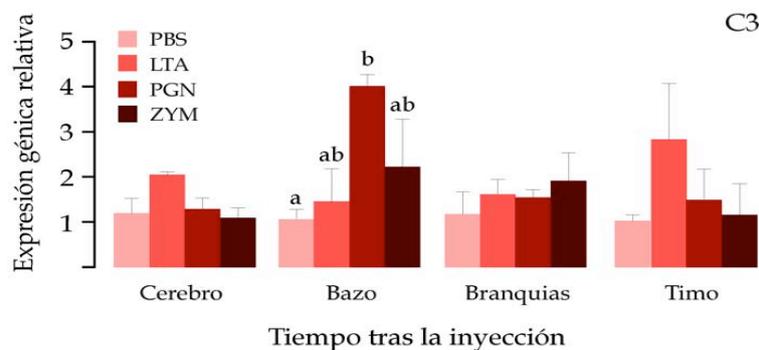


Figura 41: Expresión de C3 en tejidos 24 h tras la inyección de LTA, PGN y ZYM. Como calibrador se usó la muestra PBS 24 h. Valores con diferente letra son estadísticamente significativos.

Todos estos datos permiten confirmar que:

- * Los estímulos utilizados para activar la respuesta defensiva frente a patógenos habían sido efectivos en el desencadenamiento de respuestas transcripcionales específicas, posibilitando su utilización para estudios de secuenciación masiva de transcriptoma.

- * Los genes estudiados permiten establecer los primeros niveles de calibración para respuestas específicas según estímulo, tejido y tiempo tras la inoculación.

2) *Secuenciación de transcriptoma mediante NGS*. El análisis transcriptómico basado en secuenciación masiva tipo 454 del ARN total procedente de los 5 tejidos tomados de lenguados estimulados mediante LPS, poli I:C, PGN, LPT y ZYM arrojó los tipos de secuencia indicados en la Tabla XIV. En el ensamblaje de las secuencias útiles, se obtuvieron 96.547 unigenes (Tabla XV). Además, de las secuencias descartadas como residuos se rescataron un 13,3% aunque la mayoría no se consideraron unigenes sino singulones. En total, se obtuvieron 7.705 unigenes de más de 500 nucleótidos siendo el mayor de 1.934 nucleótidos.

Tabla XIV. Datos estadísticos de la secuenciación 454 y de la limpieza mediante SEQTRIMNEXT

	Datos
Total secuencias	1.268.785
Secuencias útiles	786.178 (62,0%)
Secuencias repetidas	226.249 (17,8%)
Secuencias de baja complejidad	60.222 (4,7%)
Secuencias cortas	158.269 (12,5%)
Secuencias contaminantes	6.743 (0,5%)
Longitud media total (bp)	221.4
Longitud media tras la limpieza (bp)	142.0

Tabla XV. Datos estadísticos del ensamblaje.

	Número de secuencias
Total secuencias	786.178
Mira Residuos	294.067
Singulones	255.095
Debris recuperados	13,3%
UniGenes sin debris/singulones	96.547
Mayor longitud de UniGene	1.934 bp
>500 bp UniGenes	7.705

La anotación de secuencias a partir de las bases de datos del UniProt se indica en la Tabla XVI, con datos de anotación para full-lengther, obteniendo un total de 18.474 unigenes con similitud a otros vertebrados.

Tabla XVI. Datos estadísticos de la anotación mediante full-lengther

	Número de unigenes
UniGenes sin debris/singulones	96.547
UniGenes con similitud a vertebrados	18.474 (19,1%)
UniGenes con similitud con diferentes ID	12.860 (13,3%)
Unigenes que contienen genes completos	834 (4,5%)
Unigenes completos con diferente ID	801 (4,3%)
Sin similitud con las bases de datos	78.073 (80,9%)

También se identificaron los polimorfismos de nucleótido por cada unigene (SNPs) y la presencia de microsatélites (SSRs) (Tabla XVII).

Tabla XVII: Datos estadísticos para SNPs y microsatélites

Estadísticas SNPs	
Total SNPs:	213662
Unigenes con SNPs:	40077
SNPs medio por unigene:	5.3
Estadísticas microsatélites	
Total SSRs:	11141
Mean SSRs per unigene:	1.1
SSRs di-nucl. :	4325
SSRs tri-nucl. :	4018
SSRs > tri-nucl. :	2798

Para favorecer el manejo de la información generada, todos los ensamblajes se han integrado en la base de datos SOLEADB disponible en <http://www.juntadeandalucia.es/agriculturaypesca/ifapa/aquagenet/soleaDB>. En dicha base de datos se podrá acceder a los ensamblajes en formato .ace así como a las anotaciones y conexiones a las bases de datos Gene Ontology, InterPro y KEGGs.

Gracias a este estudio se han podido identificar secuencias relacionadas con la ruta del complemento tal como los factores c1qlike, C1q 23Kd-like, c1r, c1s, C2 (Factor B), C3, C4-1, C4-2, C5, C6, C7-1, C7-2, C8 gamma, C8 alfa, C9, Properdin, factor D/, Factor H. Además, se han identificado varios receptores tipo Toll como el TLR1, TLR2, TLR3, TLR5S, TLR8a1, TLR8a2, TLR8B, TLR9, TLR14, TLR21. Respecto a las interleucinas se han identificado la interleucina 1B, Interleucina1B-like, Interleucina 2, Interleucina 6, Interleucina 8 type I, Interleucina 8 type II, Interleucina 8 type III, Interleucina 8 type IV, Interleucina 10, Interleucina 11a, Interleucina 11b, Interleucina 12, Interleucina 15, Interleucina 15-like, Interleucina 16, Interleucina 17C, Interleucina 17N, Interleucina 18, Interleucina 22 y sus receptores Interleucina 1 receptor type 1 (ST2L), Interleucina 1 receptor type IIa, Interleucina 5 receptor alfa, Interleucina 6 Receptor alfa, Interleucina 8 receptor CXCR1, Interleucina 8 receptor CXCR2, Interleucina 10 receptor beta chain/CRFB4, Interleucina 12 receptor beta, Interleucina 15 receptor alfa 1, Interleucina 17 receptor A, Interleucina 17 receptor alfa chain, Interleucina 20 receptor alfa. Las citoquinas y quimiocinas identificadas fueron second macrophage colony-stimulating factor, Macrophage migration inhibitory factor, Macrophage migration inhibitory factor-like, monocyte-to-macrophage differentiation factor 2, LPS-binding protein/bactericidal permeability-increasing protein, C-C motif chemokine 19, C-C motif chemokine 25, chemokine CXC10-like, C-X-C motif chemokine 14, C-X-C motif chemokine 13, C-C motif chemokine 20. Los factores antivirales identificados fueron la proteína Mx, Interferon C, factores reguladores de interferón (IRF) IRF1, IRF2, IRF3, IRF4a, IRF5, IRF7, IRF8, IRF9, IRF10. Además se identificaron varias lisozimas (g-type lysozyme 1, g-type

lysozyme 2, g-type lysozyme 3, c-type lysozyme 1, c-type lysozyme2) y antígenos de diferenciación (CD9 antigen, CD48, CD40),

3) *Regulación de la expresión génica a LPS.* Para completar los resultados de inmunoestimulación y estudiar la regulación de algunos de los genes identificados del sistema inmune innato frente a LPS, se utilizaron muestras de riñón y bazo de animales inyectados y se cuantificó la expresión génica mediante un dispositivo OPENARRAY basado en qPCR. La expresión en riñón cefálico en animales expuestos a LPS a las 12 y 24 horas se indican en la Tabla XVIII. Los datos indican respuestas específicas de cada gen con diferencias temporales. Destacar los cambios de expresión de hasta 180 veces para la Interleucina 1B a las 12 h tras la inoculación de LPS y de las lisozimas tipo G.

Tabla XVIII: Niveles de expresión y significación estadística de los genes estudiados tras los tratamientos de inducción con LPS a las 12 y 24 h. ns, no estadísticamente significativo.

Receptores Interleucinas	12h		24h	
IL1R1LIKE2	1,4934	ns	1,0716	ns
IL_2Rbeta	6,1389	*	1,2912	ns
IL_5Ralfa	2,3943	*	0,9559	ns
IL_6Ralfa	0,879	ns	1,0064	ns
IL8RCXCR1	2,1319	ns	0,9829	ns
IL8RCXCR2	0,8193	ns	0,5744	ns
IL10RBETACHA	3,6135	*	2,7624	*
IL_12RBETA	3,5114	*	2,1516	*
IL_15Ralfa	1,5799	*	1,4832	ns
IL_17Ralfa	1,4272	ns	0,8837	ns
IL_20Ralfa	1,097	ns	0,8322	ns
IL1R1_ST2L	1,5315	ns	1,0946	ns
IL1R1LIKE	1,2016	ns	0,8876	ns
Interleucinas	12h		24h	
IL1B	180,4382	*	5,9097	*
IL_2	0,6724	*	0,5153	*
IL_6	5,9906	*	5,7974	*
IL_8_TYPE_I	0,6381	*	0,6245	ns
IL_8_TYPE_II	1,1668	ns	1,0186	ns
IL_8_TYPE_III	4,348	*	2,0571	*
IL_8_TYPE_IV	1,6235	*	1,1566	ns
IL_10	1,6866	ns	1,1739	ns
IL_11A	19,58	*	2,2093	ns
IL_11B	0,7665	ns	1,146	ns
IL_12_beta	1,145	ns	0,8432	ns
IL_15	0,7968	*	1,9385	*
IL_17C	9,4547	ns	1,2615	ns
IL_16	0,8184	ns	0,753	ns
IL_17N	0,9821	ns	1,1537	ns
IL_17A	0	*	0	*
IL_18	1,4547	ns	1,046	ns
IL_22	2,1068	*	0,3599	ns
Complemento	12h		24h	
C1QLIKEPROTE	0,8364	ns	0,6485	ns
C1QLIKEPROTE	0,6887	ns	0,5496	*
C1R_	8,3056	*	14,58	*
C1S	0,6654	ns	1,6637	ns
C2_FACTOR_B	3,7913	*	2,4098	*
C3	1,1662	ns	0,8886	ns
C4-1	2,8614	ns	1,6906	ns
C4-2	1,7158	ns	0,7701	ns
C5	1,3486	ns	0,7379	ns
C6	1,5927	*	1,4721	*
C7-1	1,0894	ns	0,8982	ns
C7-2	1,6147	*	0,1045	*
C8_gamma	1,3941	ns	0,9498	ns
C8_alfa	1,5574	*	1,2369	*
C8_beta	1,2161	ns	0,5368	*
C9	1,9348	ns	1,3437	ns
FACTOR_D	1,2398	ns	1,08	ns
FACTOR_H	0,8788	ns	0,89	ns
Lisozima	12h		24h	
GLYS_1	2,5235	*	2,974	*
GLYS_2	2,416	*	2,9484	*
GLYS_3	3,0733	*	5,7097	*
CLYS_1	0,8285	ns	1,6562	ns
CLYS_2	1,1286	ns	0	ns
IRF	12h		24h	
IRF1	1,9834	*	2,1551	*
IRF2	1,4088	*	1,0994	ns
IRF3	3,5065	*	3,6946	ns
IRF4A	2,0348	ns	0,8094	ns
IRF5	0,6347	ns	0,511	ns
IRF7	0,8376	ns	2,446	ns
IRF8	1,2328	ns	1,2158	ns
IRF9	2,132	*	1,966	ns
IRF10	3,4042	*	3,9698	*
IRF	12h		24h	
TLR1	0,6126	ns	0,2243	*
TLR2	1,1949	ns	0,3073	*
TLR3	0,8663	ns	0,8214	ns
TLR3L	1,128	ns	1,0649	ns
TLR5S	33,1904	*	1,2282	ns
TLR8B	0,585	ns	0,7927	ns
TLR9	0,6141	ns	0,3664	*
TLR14	1,4356	ns	1,8441	ns
TLR21	0,7445	*	0,9425	ns
TLR22	1,2573	ns	1,1714	ns

4) *Modulación de la expresión génica por los corticoides como mediadores de la respuesta de estrés.* Para estudiar la posible influencia de los corticoides en la expresión de genes del sistema inmune se investigó el papel de la dexametasona (DXM), un potente corticoide, en la genes del sistema inmune innato así como del eje hipotalámico-hipofisiario-interrenal, GH-IGF y hipotalámico-hipofisiario-tiroideo. La exposición durante 6, 12, 24, 48 y 72 horas de alevines postmetamórficos de 20 días de edad a 0.1, 1.0 y 10.0 ppm de DMX resultó en una reducción de los niveles de transcrito de la proopiomelanocortina beta (*pomcb*) de forma dosis dependiente y un incremento significativo de la expresión de la proteína de unión a la hormona liberadora de corticotropina (*crfbp*) (Figura 42).

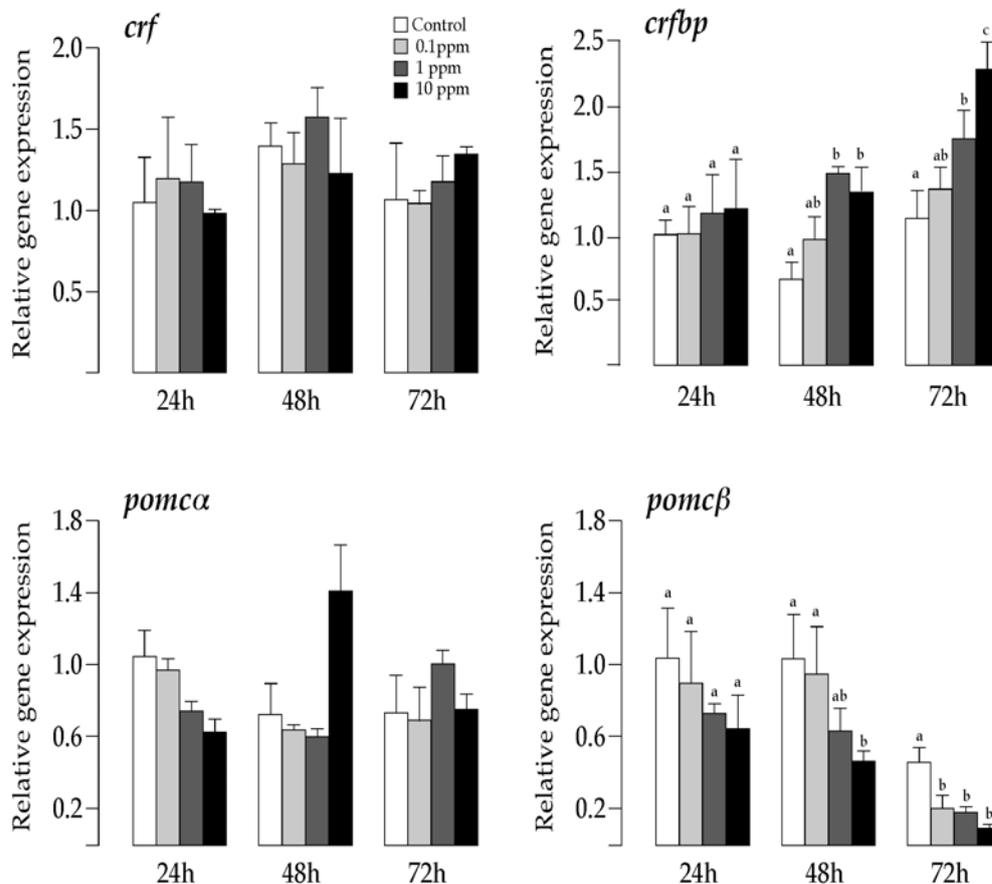


Figura 42: Expresión génica de la hormona liberadora de corticotropina (*crf*), la proteína de unión a la hormona liberadora de corticotropina (*crfbp*), proopiomelanocortina alfa y beta (*pomca* y *pomcb*)

Los receptores de glucocorticoides tipo 1 (*gr1*) y tipo 2 (*gr2*) así como las Hsp70 y Hsp90, factor similar a la insulina 1 (*igf-1*), su receptor (*igf1r*), la hormona liberadora de tirotrópina (*trh*) y la tiroglobulina (*tgb*) no modificaron su expresión con estos tratamientos (Figuras 43, 44 y 45). En cambio, la lisozima *g* redujo sus niveles de mensajero a las 72h y la *hamp1* aumentó a las 72h.

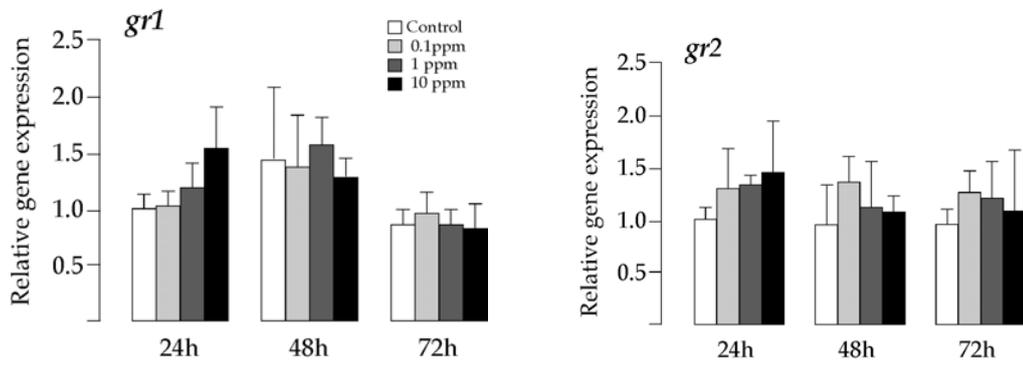


Figura 43: Expresión génica de los receptores de glucocorticoides 1 y 2.

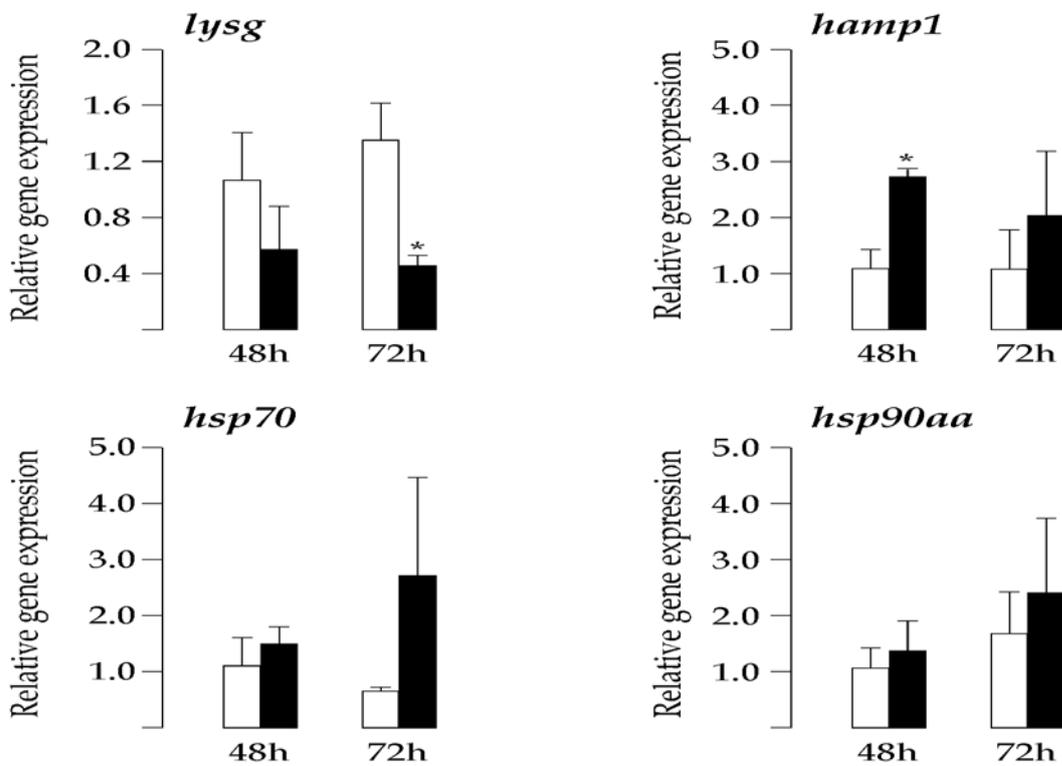


Figura 44: Expresión génica de los receptores de la lisozima g, hepcidina (*hamp1*), hsp70 y hsp90.

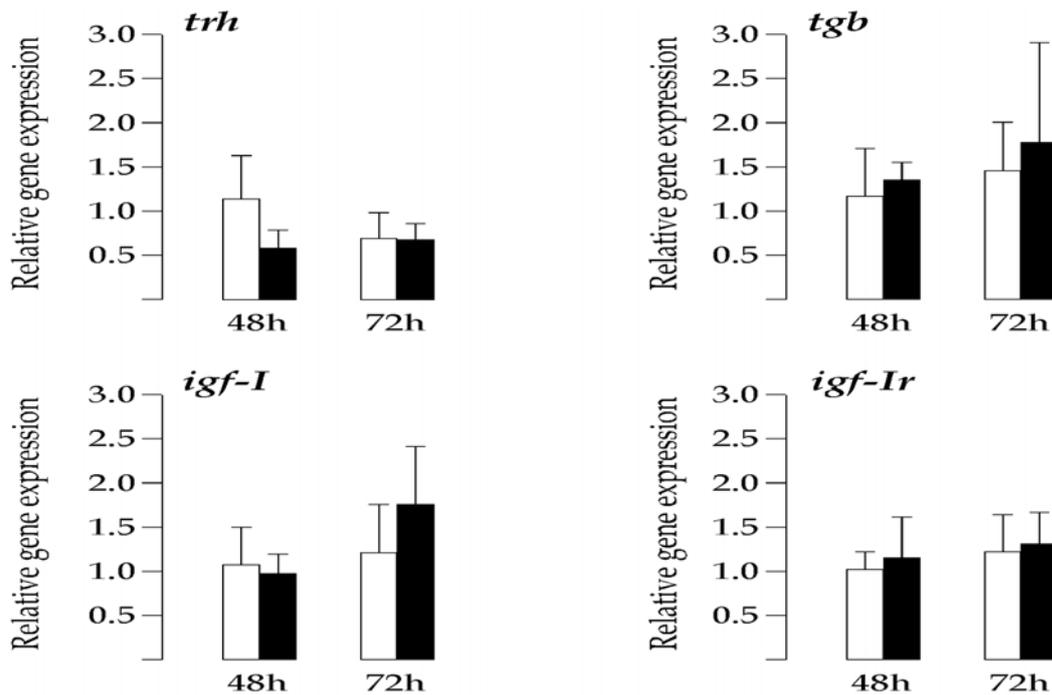


Figura 45: Expresión génica de la *igf-i*, su receptor *igf-ir*, *trh* y la *tgb*.

Cuando los alevines de lenguado se expusieron de forma continua durante dos semanas a 10 ppm de DXM, se volvió a confirmar la represión de *pomcB* y la activación de la transcripción de *crfbp* sugiriendo un feedback negativo en eje hipotalámico-hipofisario-interrenal (Figuras 46, 47 y 48). La exposición prolongada determinó además una represión de la expresión de la *hamp1*. Estos datos coinciden con resultados previos que mostraban niveles reducidos de *hamp1* ante situaciones de estrés prolongado asociado con altas densidades. Además, se encontró un incremento (4,5 respecto al control) y una reducción (4,6 respecto al control) de los niveles de transcrito de *hsp70* en la primera y segunda semana de exposición, respectivamente. Esta respuesta dual encontrada en la *hamp1* y *hsp70* representaría un mecanismo compensatorio para activar la resistencia innata como parte de una respuesta rápida a un estrés agudo para posteriormente reducirse ante un estrés más prolongado.

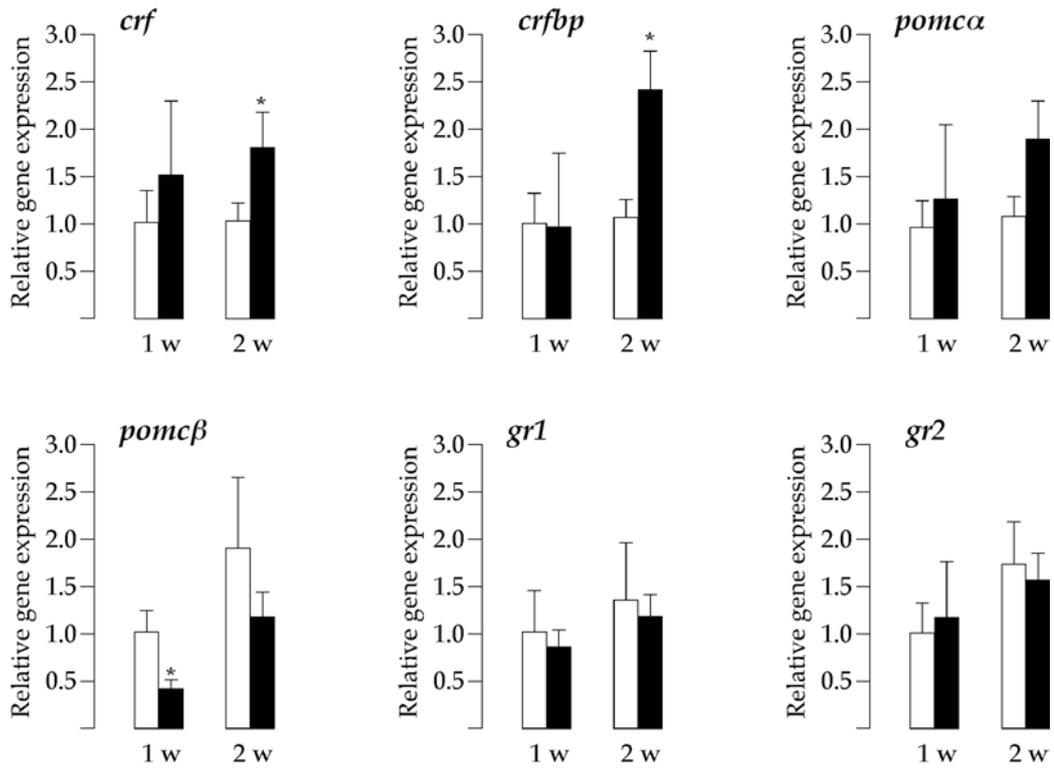


Figura 46: Expresión génica de la *crf*, *crfbp*, *pomca*, *pomcb*, *gr1* y *gr2* tras 1 (1w) o 2 (2w) semanas de exposición a DXM.

La exposición prolongada a DXM redujo el peso de los animales en ~20% tras dos semanas de exposición (grupo control $2,95 \pm 0,52\text{g}$ (media \pm SD); animales tratados con DXM $2.35 \pm 0.46\text{ g}$; t-student $P=0.00029$). Esta reducción en el peso estuvo asociada a una reducción de los transcritos de *igf-I* (3.2 veces inferior al control) a las dos semanas de exposición (Figura 48).

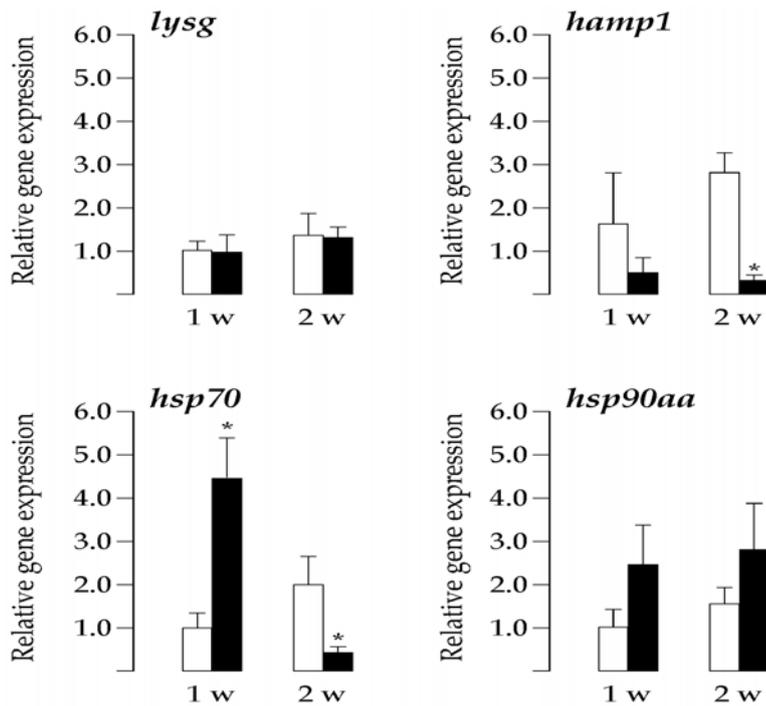


Figura 47: Expresión génica de la *lys**g*, *hamp1*, *hsp70*, y *hsp90AA* tras 1 (1w) o 2 (2w) semanas de exposición a DXM.

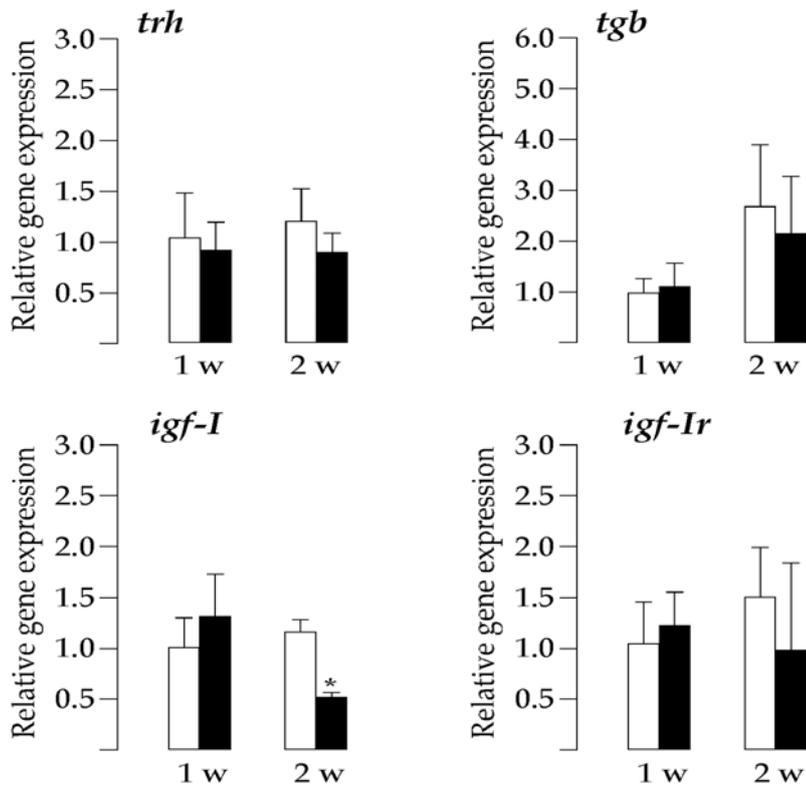


Figura 48: Expresión génica de la *trh*, *tgb*, *igf-i*, e *igf-Ir* tras 1 (1w) o 2 (2w) semanas de exposición a DXM

Para demostrar el efecto de la DXM sobre la susceptibilidad a patógenos, los animales tras 2 semanas de exposición a DXM se infectaron con *Photobacterium damsela piscicida*. Las dosis ensayadas fueron 5×10^6 and 5×10^4 , respectivamente. Los datos de mortalidad acumulada al día 4 tras la inoculación fueron de 36.8 y 5.4 % para las dosis 5×10^6 y 5×10^4 , respectivamente alcanzando el 90.9 and 63.6% al día 7 en los animales tratados con DXM (Figura 49). La mortalidad en el control no tratado con DXM la mortalidad fue del 15,4 y 30,8 para 5×10^6 y 5×10^4 , respectivamente.

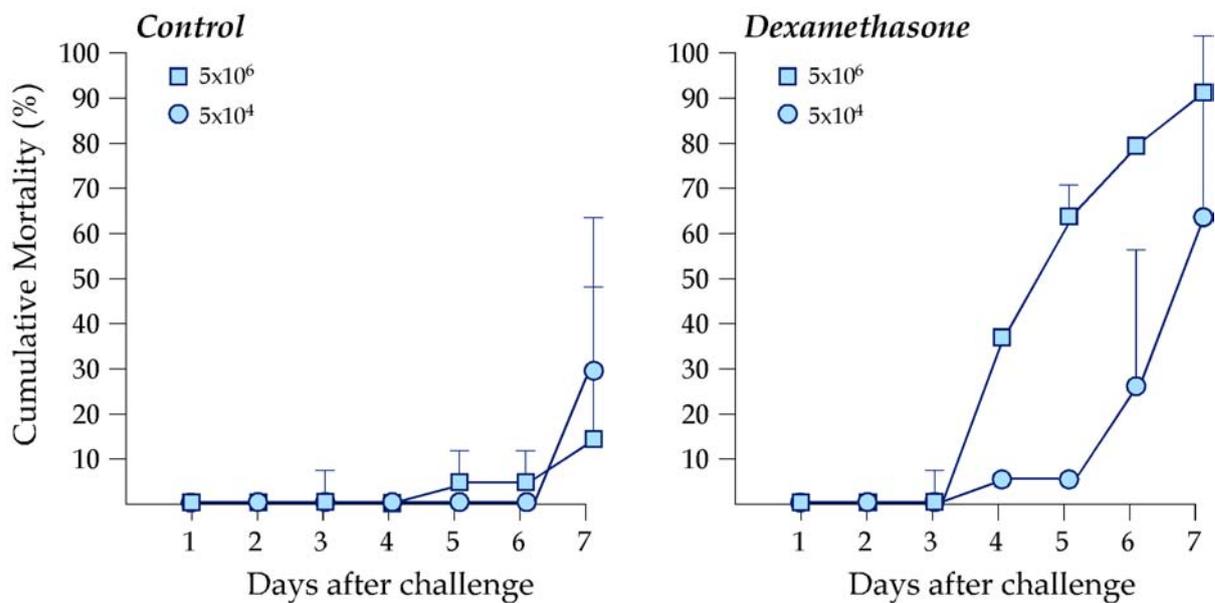


Figura 49: Mortalidad media acumulada (\pm SE) de los lenguados tratados con DXM y controles, tras la exposición por inmersión frente *Ph. d. piscicida*. Se indican la mortalidad para 5×10^4 (círculos) y 5×10^6 (cuadrados) CFU mL⁻¹.

Estudios sobre la ontogenia del sistema inmune.

El estudio de la expresión de genes implicados en la inmunidad durante el desarrollo larvario contempló el periodo de vida entre 2 y 21 días tras la eclosión. El seguimiento de la ontogenia del sistema inmune innato se basó en datos sobre la expresión de lisozima g, hepcidina y la fracción C3. La expresión de la lisozima g y la fracción C3 se activa al comienzo de la metamorfosis de forma progresiva indicando la edad de inicio de maduración del sistema inmune innato (Figura 50). Este incremento en los niveles de transcrito coincide con el desarrollo del timo y la maduración de órganos relacionados con el sistema inmune. En el caso de la *hamp1*, los niveles de expresión variaron muy poco y solo se observaron dos picos en los días 13 y 16 después de la eclosión (2.3 veces más que el día 2 en ambos casos).

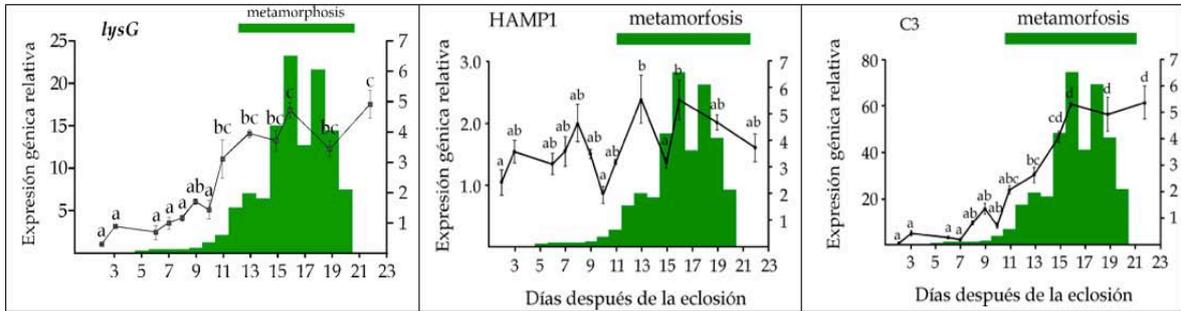


Figura 50: Expresión de la *lysG*, *hamp1* y C3 durante el desarrollo larvario. El eje de la derecha indica la concentración de hormona T4 cuyos niveles están en gris. El día 1 se utilizó como calibrador. Las letras diferentes indica diferencias significativas.

Estos resultados indican que lisozima g y C3 pueden representar el inicio del desarrollo del sistema inmune innato del lenguado y que también su actividad se inicia ya al comienzo de la metamorfosis, pudiendo reflejar la edad más temprana de adquisición de inmunocompetencia.

2.4.2.2. Resultados para el objetivo B.2. Evaluar las modificaciones de la respuesta inmune por las condiciones de manejo en cultivo.

Determinación de indicadores de estrés en *Solea senegalensis*.

Como indicador de estrés, se estudió la expresión del gen de la proteína Steroidogenic Acute Response Protein (StAR), la cual está directamente relacionada con el transporte del colesterol a la mitocondria para la producción de cortisol y ampliamente utilizado como indicador de respuesta de estrés. Del mismo modo, se estudió la expresión de los receptores de glucocorticoides, (GR1 y GR2), los cuales fueron secuenciados en el presente estudio. El diseño de oligos de la STAR (steroidogenic acute regulatory protein) en *Solea senegalensis*, se llevó a cabo a partir de la secuencia completa de sus bases publicadas en el GenBank: Acc no HQ392856.1. El GR1 (glucocorticoid receptor 1) y GR2 (glucocorticoid receptor 2) fueron clonados y secuenciados parcialmente a partir de secciones conservadas del GR en otras especies de peces planos.

Un grupo importante de genes relacionados con la respuesta al estrés es el derivado de la cascada de eicosanoides, cuyos productos finales regulan los procesos inflamatorios, así como la respuesta de estrés, modulando incluso la producción de cortisol en las células interrenales. Los genes que se han puesto a punto son: Fosfolipasa A2 (PLA2), Ciclooxigenasa (COX2), Lipooxigenasa (LOX) y los genes de receptores de prostaglandina (EP2, EP3 y EP4). También se ha incluido la delta 6 desaturasa, relacionada con la capacidad del animal para la desaturación de ácidos grasos.

Efecto de la acción combinada de la utilización de aceites vegetales y la manipulación sobre la respuesta a estrés en juveniles de lenguado.

Desde hace tiempo, existe una fuerte tendencia para sustituir la mayor parte posible de los ingredientes de origen marino en los piensos compuestos, especialmente el aceite de pescado. Está bien descrito en la literatura para otras especies que las variaciones de los tipos de lípidos en la dieta tienen una influencia directa en la capacidad de respuesta frente a condiciones estresantes, por el papel modulador de los lípidos dietéticos en la síntesis de cortisol, principal corticosteroide involucrado en la respuesta a estrés de peces. No obstante, los lípidos dietéticos también son capaces de modular la expresión de genes relacionados con diferentes procesos, incluidos aquellos relacionados con la movilización de energía frente a situaciones de demanda, con los relacionados con activación de procesos de defensa inmunológica y/o con aquellos relacionados con la respuesta de estrés. Por ello, se estudió el efecto que la sustitución de aceite de pescado por aceites vegetales ejerce sobre el estado inmune en juveniles de lenguado senegalés, evaluándose los diferentes genes relacionados con los receptores de glucocorticoides y con la cascada de eicosanoides, como enlace de la respuesta de estrés con la respuesta inmune.

Después de cultivar durante tres meses un grupo de 270 juveniles de *S. senegalensis* con una dieta control basada en aceite de pescado (Dieta FO), y dos dietas en las que se realizó una sustitución total de aceite de pescado por aceite de lino (Dieta LO) o aceite de soja (Dieta SO), los juveniles de lenguado fueron sometidos a estrés, consistente en 5 minutos de persecución con red. Al final del periodo experimental los animales alimentados con la dieta basada en aceite de soja (SO) mostraron un crecimiento significativamente menor (Figura 51) comparados con los animales alimentados con la dieta control (FO), o los alimentados con la dieta basada en aceite de lino (LO). No hubo diferencias significativas para la supervivencia, que estuvo en torno al 80% en todos los tratamientos.

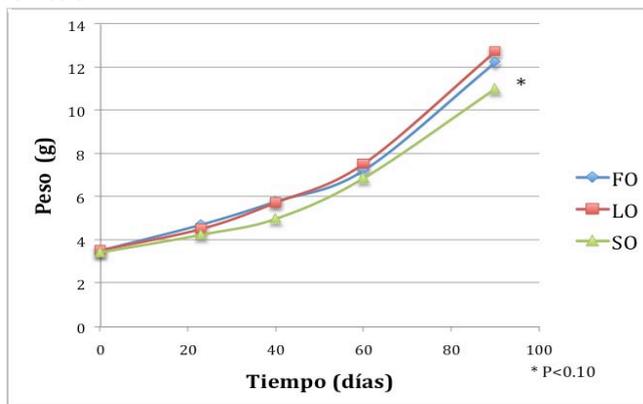


Figura 51. Crecimiento de *Solea senegalensis* alimentado con las distintas dietas experimentales

El estrés debido a manipulación aumentó los niveles de transcripción de GR1 y GR2 en el hígado de los animales empleados, no encontrándose diferencias entre animales estresados por persecución con red y no estresados para las dietas LO y SO, en hígado (Figura 52).

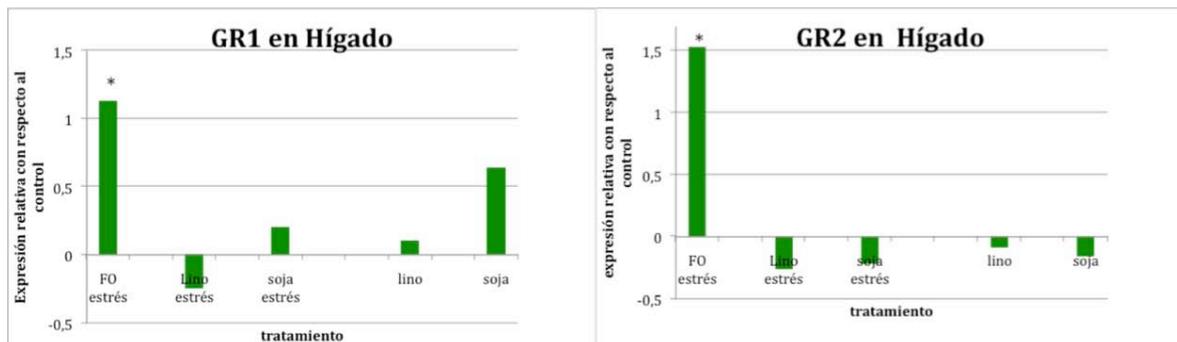


Figura 52. Expresión génica de los receptores de glucocorticoides en hígado de lenguado, según la dieta empleada y el factor de estrés inducido.

No se detectaron diferencias entre dietas para los niveles de GR1 y GR2 en el intestino de los animales estresados, aunque los niveles de transcripción de los animales alimentados con lino sin estrés fueron significativamente ($p < 0.05$) mayores que el resto de los tratamientos e iguales al tratamiento control. No hubo diferencias en GR1, que sigue la misma tendencia que el GR2, con mayores valores en los animales alimentados con lino y sin estrés (Figura 53). En el músculo, para la dieta FO, los valores de transcripción para GR2 se encuentran

disminuidos con respecto al control y el GR1 por el contrario, aparecen aumentados (Figura 54).

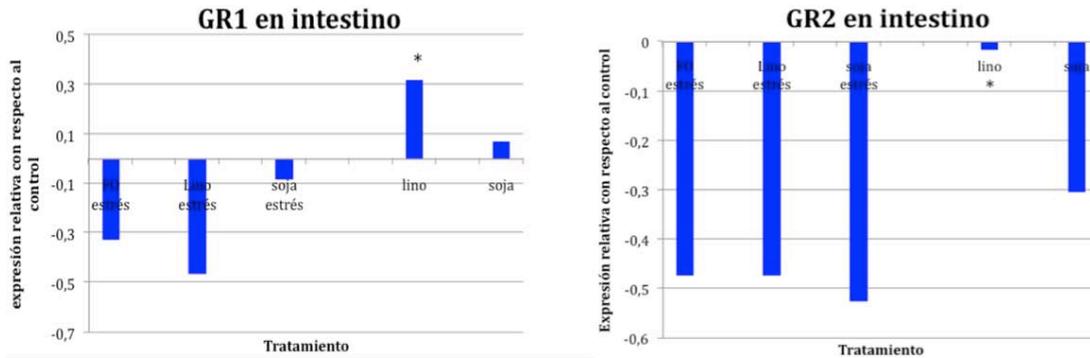


Figura 53. Expresión génica de los receptores de glucocorticoides en intestino de lenguado, según la dieta empleada y el factor de estrés inducido.

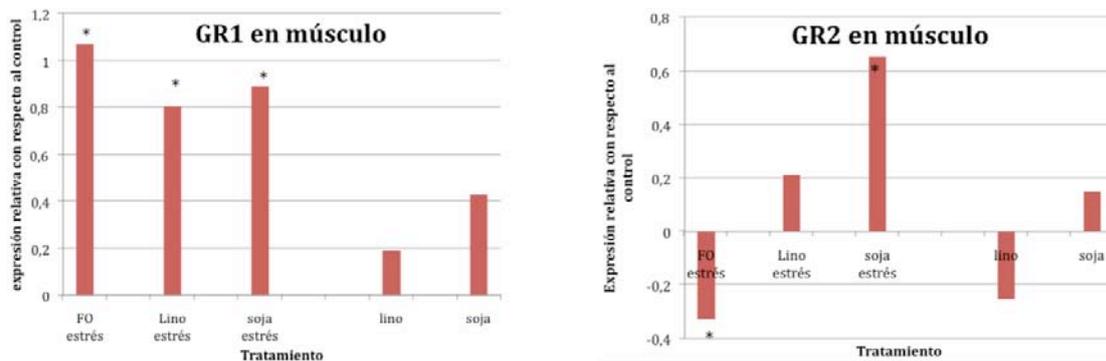


Figura 54. Expresión génica de los receptores de glucocorticoides en músculo de lenguado, según la dieta empleada y el factor de estrés inducido.

Los niveles de transcripción de la HSP70 en intestino no mostraron cambios entre dietas (Figura 55). Sin embargo para músculo se observa un incremento para animales estresados en cualquier dieta, con tendencia al aumento para la dieta FO con respecto al resto de dietas (Figura 56). La transcripción de este gen no ha sido realizada aún en hígado.

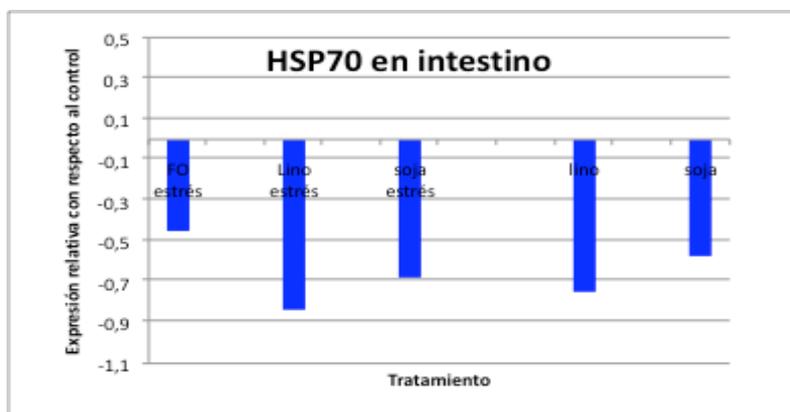


Figura 55. Expresión génica de HSP70 en intestino de lenguado, según la dieta empleada y el factor de estrés inducido.

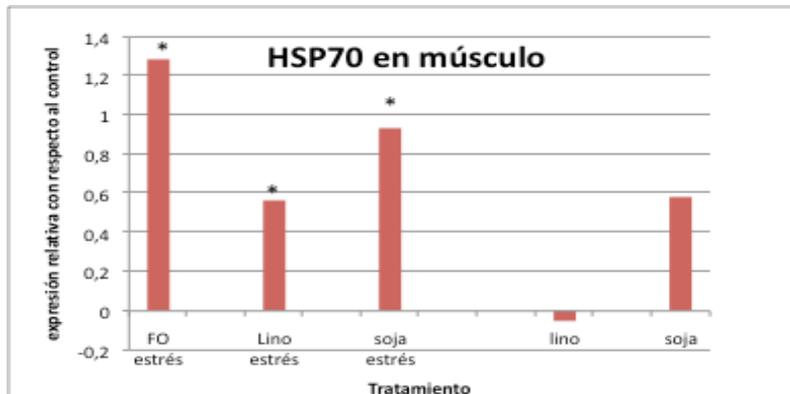


Figura 56. Expresión génica de HSP70 en músculo de lenguado, según la dieta empleada y el factor de estrés inducido.

Los niveles de transcripción de la HSP90A en intestino y músculo son similares para todas las dietas (Figura 57). Los valores para músculo son significativamente ($P < 0.05$) mayores para los animales estresados cuando se comparan con los animales sin estresar de sus respectivas dietas. No fue detectada en hígado para ninguna dieta en estado control o estresado por persecución con red.

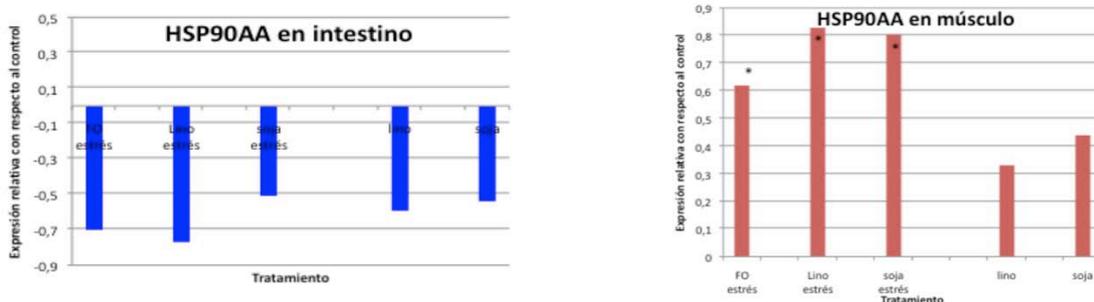


Figura 57. Expresión génica de HSP90AA en intestino y músculo de lenguado, según la dieta empleada y el factor de estrés inducido.

Los niveles de transcripción de la HSP90B decrecen de manera similar en las muestras de intestino e hígado para todas las dietas en condiciones de estrés, mientras que en el músculo presentan un aumento para la dieta SO (Figura 58).

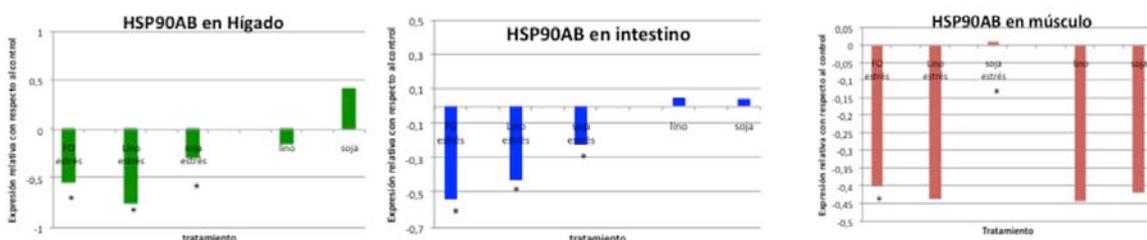


Figura 58. Expresión génica de HSP90AB en hígado, intestino y músculo de lenguado, según la dieta empleada y el factor de estrés inducido.

Los niveles de transcripción de la STAR, tanto en intestino como en músculo fueron muy bajos, y no existió diferencia entre animales control y animales estresados por persecución con red para ninguna de las dietas experimentales, aunque los valores para la dieta control fueron más bajos (Figura 59). No fue detectado en hígado para ninguna dieta en estado control o estresado por persecución con red. No obstante, cabe destacar que los niveles de transcripción absolutos de la STAR son relativamente pequeños, pudiéndose hablar de una muy baja expresión de este gen.

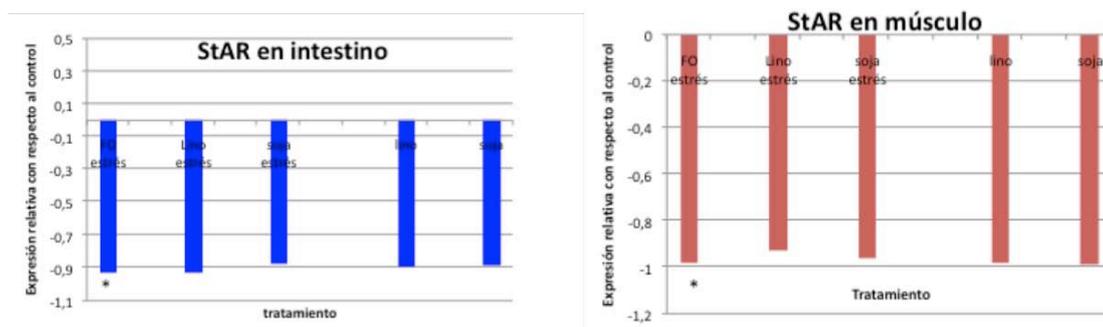


Figura 59. Expresión génica de la STAR en intestino y músculo de lenguado, según la dieta empleada y el factor de estrés inducido.

La sustitución del aceite de pescado por aceite de soja o aceite de lino hizo variar los perfiles de ácidos grasos de las dietas experimentales (Tabla XIX). La inclusión de aceite de lino incrementa la cantidad de ácido alfa linolénico (18:3n-3, ALA), característico de este aceite. La inclusión de aceite de lino incrementa la cantidad de ácido linoleico (18:2n-6, LA), característico de este aceite vegetal, disminuyendo la relación n-3/n-6 en la dieta. La utilización de cualquier aceite vegetal disminuye la cantidad de ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga (LC-PUFA).

Las Tablas XX, XXI y XXII presentan los perfiles de ácidos grasos del músculo, hígado e intestino respectivamente. Los distintos tejidos reflejaron la composición de ácidos grasos de la dieta, presentando cantidades elevadas de ALA en aquellos animales alimentados con la dieta 100LO y cantidades elevadas de LA en aquellos animales alimentados con la dieta 100SO, en cualquiera de los tejidos estudiados. La cantidad de EPA disminuye con la utilización de aceites vegetales, mientras que hay una retención selectiva de DHA en músculo y, principalmente, en intestino.

La relación n-3/n-6 se vio comprometida en los tejidos de aquellos animales alimentados con la dieta con sustitución por aceite de soja. Este equilibrio entre ácidos grasos es imprescindible para un equilibrio homeostático de múltiples procesos metabólicos, incluido el sistema inmune, principalmente entre procesos proinflamatorios y antiinflamatorios. Cualquier desajuste en esta relación provoca desajustes en la capacidad inmunológica del individuo.

Tabla XIX: Composición de ácidos grasos de las dietas experimentales (g/100g de ácido graso identificado)

Ácido graso	Dietas		
	100FO	100LO	100SO
14:0	4.90	3.19	3.34
14:1n-7	0.02	0.01	0.02
15:0	0.33	0.21	0.30
16:0ISO	0.04	0.02	n.d.
16:0	19.86	15.66	15.80
16:1n-7	6.03	3.64	2.89
16:1n-5	0.25	0.18	0.20
16:2n-6	0.88	0.53	0.32
16:2n-4	0.00	0.61	0.41
17:0	0.91	0.04	0.42
16:3n-4	0.32	0.06	0.04
16:4n-3	1.32	1.00	0.65
18:0	4.11	4.96	3.01
18:1n-9	18.28	19.04	11.97
18:1n-7	2.99	2.12	1.41
18:1n-5	0.10	0.06	0.05
18:2n-6	6.10	9.58	36.78
18:3n-6	0.20	0.06	0.14
18:3n-4	0.25	0.05	0.03
18:3n-3	2.12	20.51	6.76
18:4n-3	0.98	0.57	0.46
18:4n-1	0.41	0.12	0.08
20:0	0.17	0.25	0.16
20:1n-9	1.37	0.54	0.34
20:2n-9	0.10	0.05	0.05
20:4n-6	0.78	0.52	0.60
20:3n-3	n.d.	0.08	0.05
20:4n-3	0.76	0.30	0.40
20:5n-3	11.96	8.84	5.63
22:1n-11	0.45	0.19	0.13
22:5n-3	3.15	1.28	2.65
22:6n-3	11.11	5.70	4.92
Total saturados	30.33	24.91	23.02
Total monoenos	29.49	25.84	17.43
∑n-3	31.39	38.28	21.52
∑n-6	7.34	10.21	37.54
∑n-9	19.76	19.63	12.36
∑n-3 LC-PUFA	26.97	16.20	13.65
ARA/EPA	0.07	0.06	0.11
EPA/DHA	1.08	1.55	1.14
n-3/n-6	4.28	3.75	0.57

Tabla XX. Ácidos grasos del músculo de los peces alimentados con las dietas experimentales. (g/100g ácidos grasos identificados).

Ácidos grasos	Dietas		
	100FO	100LO	100SO
14:0	3.33± 0.15	2.20± 0.27	2.06± 0.18
14:1n-7	0.08± 0.00	n.d.	n.d.
15:0	0.25± 0.02	0.17 ± 0.03	0.16 ± 0.05
16:0ISO	0.03 ± 0.02	0.16 ± 0.04	0.04 ± 0.01
16:0	19.03± 1.24	16.59± 1.71	16.53± 2.07
16:1n-7	4.28 ± 0.41	3.15± 0.45	2.97± 0.84
16:1n-5	0.12 ± 0.03	0.06 ± 0.02	0.06 ± 0.01
16:2n-6	0.45 ± 0.08	0.31 ± 0.04	0.26 ± 0.05
16:2n-4	0.27± 0.01	0.20 ± 0.02	0.18 ± 0.05
17:0	0.40± 0.04	0.25± 0.03	0.25 ± 0.02
16:3n-4	0.09± 0.02	0.13 ± 0.04	0.08 ± 0.01
16:4n-3	0.35± 0.05	0.25 ± 0.06	0.21 ± 0.03
18:0	3.38± 0.24	3.77± 0.18	3.24± 0.11
18:1n-9	28.10± 2.14 ^a	20.37±2.41 ^b	29.24 ± 2.71 ^a
18:1n-7	5.68 ± 0.70 ^a	1.90± 0.48 ^b	2.51 ± 0.36 ^b
18:1n-5	0.26± 0.07	0.15 ± 0.04	n.d.
18:2n-6	6.61± 1.04 ^a	9.43±0.98 ^a	22.27 ± 0.77 ^b
18:3n-6	0.16± 0.03	0.13 ± 0.01	0.17 ± 0.05
18:3n-4	0.07± 0.01	0.03 ± 0.00	n.d.
18:3n-3	1.98± 0.28 ^a	20.39±3.14 ^b	3.84± 0.16 ^c
18:4n-3	0.86± 0.12	0.85 ± 0.07	0.50± 0.09
18:4n-1	0.06 ± 0.01	0.07 ± 0.01	n.d.
20:0	0.22± 0.02 ^a	0.12 ± 0.01 ^b	0.19 ± 0.04 ^a
20:1n-9	3.46± 0.51	2.45 ± 0.73	2.61± 0.98
20:2n-9	0.17± 0.01	0.11 ± 0.01	0.08 ± 0.00
20:4n-6	0.53± 0.15 ^a	0.43 ± 0.08 ^{ab}	0.34 ± 0.07 ^b
20:3n-3	0.06 ± 0.01 ^a	0.76 ± 0.03 ^b	0.43 ± 0.02 ^c
20:4n-3	0.28± 0.04	0.24 ± 0.02	0.19± 0.03
20:5n-3	5.57± 0.71 ^a	4.16± 0.62 ^{ab}	3.13± 0.66 ^b
22:1n-11	2.45± 0.18	1.80± 0.27	1.83± 0.34
22:5n-3	0.87± 0.09	0.64± 0.07	0.51 ± 0.05
22:6n-3	10.96 ± 1.91	8.73±1.76	6.24±2.84
∑saturados	26.52± 3.27	23.21±3.81	22.40 ± 3.71
∑monoenos	44.41± 3.47 ^a	30.14±3.92 ^b	39.33± 4.22 ^{ab}
∑n-3	20.93± 3.14 ^a	36.02±4.07 ^b	15.06± 3.78 ^a
∑n-6	7.37± 1.08 ^a	10.03±1.24 ^a	22.79± 2.35 ^b
∑n-9	31.77± 2.21 ^a	22.93±1.87 ^b	31.95 ± 1.61 ^a
∑n-3 LC-PUFA	17.74± 2.54 ^a	14.54±2.04 ^{ab}	10.50± 1.01 ^b
ARA/EPA	0.10 ± 0.04	0.10 ± 0.05	0.11 ± 0.02
EPA/DHA	0.51 ± 0.02	0.48 ± 0.02	0.50 ± 0.03
n-3/n-6	2.84± 0.14 ^a	3.59± 0.21 ^b	0.66 ± 0.04 ^c

Tabla XXI. Ácidos grasos del hígado de los peces alimentados con las dietas experimentales. (g/100g ácidos grasos identificados).

Ácidos grasos	Dietas		
	100FO	100LO	100SO
14:0	4.70 ± 0.32 ^a	2.12 ± 0.27 ^b	1.77 ± 0.18 ^b
14:1n-7	0.04 ± 0.01	n.d.	n.d.
15:0	0.24 ± 0.07 ^a	0.13 ± 0.03 ^b	0.11 ± 0.05 ^b
16:0ISO	n.d.	n.d.	n.d.
16:0	19.02 ± 1.57 ^a	13.62 ± 1.71 ^b	15.48 ± 2.07 ^{ab}
16:1n-7	8.28 ± 1.22 ^a	3.00 ± 0.45 ^b	3.65 ± 0.84 ^b
16:1n-5	n.d.	n.d.	0.06 ± 0.01
16:2n-6	0.77 ± 0.12 ^a	0.25 ± 0.04 ^b	0.26 ± 0.05 ^b
16:2n-4	0.24 ± 0.02	0.15 ± 0.02	0.17 ± 0.05
17:0	0.93 ± 0.07 ^a	0.28 ± 0.03 ^b	0.33 ± 0.02 ^b
16:3n-4	n.d.	n.d.	n.d.
16:4n-3	1.02 ± 0.06 ^a	0.14 ± 0.06 ^b	0.14 ± 0.03 ^b
18:0	5.58 ± 0.39	4.76 ± 0.18	5.54 ± 0.11
18:1n-9	18.94 ± 3.38	22.21 ± 2.41	24.51 ± 2.71
18:1n-7	3.85 ± 1.02	2.96 ± 0.48	3.13 ± 0.36
18:1n-5	0.22 ± 0.09 ^a	0.06 ± 0.04 ^b	0.08 ± 0.02 ^b
18:2n-6	5.65 ± 1.52 ^a	10.92 ± 0.98 ^b	27.68 ± 0.77 ^c
18:3n-6	0.31 ± 0.01 ^a	0.23 ± 0.01 ^a	2.09 ± 0.05 ^b
18:3n-4	0.31 ± 0.03 ^a	0.08 ± 0.00 ^b	0.11 ± 0.05 ^{ab}
18:3n-3	1.01 ± 0.30 ^a	24.35 ± 3.14 ^b	2.50 ± 0.28 ^c
18:4n-3	1.56 ± 0.12 ^a	0.82 ± 0.07 ^b	0.51 ± 0.09 ^b
18:4n-1	0.55 ± 0.01 ^a	0.13 ± 0.01 ^b	0.12 ± 0.02 ^b
20:0	0.30 ± 0.02 ^a	0.12 ± 0.01 ^b	0.15 ± 0.04 ^b
20:1n-9	1.87 ± 0.51	1.43 ± 0.73	1.11 ± 0.98
20:2n-9	0.55 ± 0.23	0.24 ± 0.13	0.40 ± 0.08
20:4n-6	0.94 ± 0.15 ^a	0.20 ± 0.08 ^b	0.28 ± 0.07 ^b
20:3n-3	0.08 ± 0.01 ^a	1.16 ± 0.02 ^b	0.34 ± 0.03 ^c
20:4n-3	0.12 ± 0.04	0.09 ± 0.04	0.10 ± 0.04
20:5n-3	9.27 ± 0.71 ^a	1.88 ± 0.62 ^b	2.32 ± 0.66 ^b
22:1n-11	1.19 ± 0.18	1.21 ± 0.27	0.58 ± 0.34
22:5n-3	4.91 ± 0.09 ^a	1.40 ± 0.07 ^b	1.40 ± 0.05 ^b
22:6n-3	7.56 ± 0.91 ^a	6.08 ± 0.76 ^{ab}	5.08 ± 0.84 ^b
Total saturados	30.08 ± 3.27 ^a	23.39 ± 3.81 ^b	23.23 ± 3.71 ^b
Total monoenos	35.31 ± 3.47	30.37 ± 3.92	33.44 ± 4.22
∑n-3	25.53 ± 3.14 ^a	35.53 ± 4.07 ^b	12.39 ± 3.78 ^c
∑n-6	7.21 ± 1.08 ^a	10.10 ± 1.24 ^a	30.17 ± 2.35 ^b
∑n-9	21.36 ± 2.21	23.11 ± 1.87	26.02 ± 1.61
∑n-3 LC-PUFA	21.94 ± 2.54 ^a	13.88 ± 2.04 ^b	9.24 ± 1.01 ^b
ARA/EPA	0.10 ± 0.04	0.10 ± 0.05	0.12 ± 0.02
EPA/DHA	1.21 ± 0.02 ^a	0.48 ± 0.02 ^b	0.46 ± 0.03 ^b
n-3/n-6	3.54 ± 0.14 ^a	3.52 ± 0.21 ^a	0.41 ± 0.04 ^b

Letras diferentes en una línea denotan diferencias significativas (P<0.05). n=10x3

Tabla XXII. Ácidos grasos del intestino de los peces alimentados con las dietas experimentales. (g/100g ácidos grasos identificados)

Ácidos grasos	Dietas		
	100FO	100LO	100SO
14:0	5.60± 0.15 ^a	2.14± 0.35 ^b	3.07± 0.43 ^b
14:1n-7	0.06± 0.00	n.d.	n.d.
15:0	0.35± 0.02	0.22± 0.05	0.21± 0.06
16:0ISO	0.13± 0.02	0.12± 0.04	n.d.
16:0	22.39± 1.24 ^a	16.63± 1.22 ^b	16.48± 2.97 ^b
16:1n-7	8.10± 0.41 ^a	2.46± 0.39 ^b	4.19± 1.34 ^b
16:1n-5	0.17± 0.09	n.d.	n.d.
16:2n-6	0.88± 0.08 ^a	0.32± 0.04 ^b	0.47± 0.06 ^b
16:2n-4	0.34 ± 0.01	0.26± 0.04	0.22± 0.06
17:0	0.89± 0.04 ^a	0.27 ± 0.12 ^b	0.48± 0.21 ^b
16:3n-4	0.17± 0.06	0.25± 0.05	0.09± 0.06
16:4n-3	1.06± 0.17 ^a	0.26± 0.11 ^b	0.46± 0.13 ^b
18:0	6.08± 0.56 ^{ab}	8.70± 0.7 ^a	4.85± 0.61 ^b
18:1n-9	14.68± 2.97	18.43± 2.83	19.71± 3.01
18:1n-7	3.91± 0.70	2.39± 0.61	2.82± 0.59
18:1n-5	0.18± 0.07	0.21± 0.06	0.19± 0.04
18:2n-6	8.53± 1.04 ^a	14.86± 1.39 ^b	31.16± 3.55 ^c
18:3n-6	0.20± 0.03 ^a	0.12± 0.03 ^b	0.31± 0.02 ^c
18:3n-4	0.26± 0.01 ^a	0.11± 0.04 ^b	0.14± 0.02 ^b
18:3n-3	1.33± 0.28 ^a	18.98± 2.43 ^b	2.78± 0.37 ^a
18:4n-3	1.33± 0.12 ^a	0.34± 0.06 ^b	0.61± 0.08 ^a
18:4n-1	0.46± 0.01 ^a	0.14± 0.02 ^b	0.21± 0.02 ^b
20:0	0.29± 0.02	0.18± 0.02	0.22± 0.03
20:1n-9	1.78± 0.51	1.35± 0.44	1.65± 0.68
20:2n-9	0.30± 0.01 ^a	0.08± 0.04 ^b	0.17± 0.03 ^c
20:4n-6	1.50± 0.15 ^a	0.63± 0.12 ^b	0.49± 0.09 ^b
20:3n-3	n.d.	0.43 ± 0.16	0.22 ± 0.04
20:4n-3	0.61 ± 0.04 ^a	0.29 ± 0.05 ^b	0.30 ± 0.06 ^b
20:5n-3	8.09 ± 0.71 ^a	2.41 ± 0.96 ^b	3.02 ± 0.77 ^b
22:1n-11	1.29 ± 0.18	0.99 ± 0.17	1.12 ± 0.27
22:5n-3	2.29 ± 0.09 ^a	0.63 ± 0.04 ^b	0.72 ± 0.08 ^b
22:6n-3	6.76 ± 0.91	5.80 ± 0.97	3.64 ± 0.73
Total saturados	35.17 ± 3.27 ^a	28.26 ± 3.42 ^{ab}	25.05 ± 3.66 ^b
Total monoenos	31.07 ± 3.47	26.10 ± 3.71	30.16 ± 3.91
∑n-3	21.46 ± 3.14 ^{ab}	29.14 ± 4.66 ^a	11.75 ± 2.88 ^b
∑n-6	10.49 ± 1.08 ^a	15.72 ± 1.55 ^a	32.11 ± 2.81 ^b
∑n-9	16.75 ± 2.21 ^a	19.86 ± 2.81 ^{ab}	21.52 ± 1.99 ^b
∑n-3 LC-PUFA	17.74 ± 2.54 ^a	9.56 ± 1.01 ^b	7.90 ± 1.18 ^b
ARA/EPA	0.19 ± 0.04 ^a	0.26 ± 0.02 ^b	0.16 ± 0.03 ^a
EPA/DHA	1.20 ± 0.02 ^a	0.42 ± 0.04 ^b	0.83 ± 0.01 ^c
n-3/n-6	2.04 ± 0.14 ^a	1.85 ± 0.31 ^a	0.37 ± 0.11 ^c

En relación a la expresión de los genes relacionados con la cascada de eicosanoides, no se encontraron diferencias significativas en la expresión relativa de los genes PLA2 y LOX5 en el intestino (Figura 60.A). Sin embargo, los animales estresados y no estresados alimentados con cualquiera de las dietas experimentales tienden a una sobre-expresión relativa del gen PLA2, mientras que ocurre lo contrario para el gen LOX5, donde se observa una sub-expresión. El estrés por persecución provocó una disminución significativa ($P < 0,05$) de la expresión relativa COX2 para cualquiera de los tratamientos dietéticos ensayados (Figura 60.A).

La utilización de aceites vegetales no provocó ningún efecto significativo sobre la expresión relativa del gen EP3 de el intestino, pero si hay un efecto combinado del estrés y la dieta, ya que todos los animales estresados alimentados con VO mostraron valores bajos, y aquellos alimentados con la dieta 100LO, mostraron una disminución significativa ($P < 0,05$) en la expresión relativa del gen EP3 en comparación con los peces alimentados con esa misma dieta sin mediar estrés. Lo mismo ocurre para la expresión relativa del gen EP2 para los peces estresados alimentados con cualquiera de las dietas experimentales (Figura 60.B). La situación de estrés provoca un efecto directo en la expresión relativa del gen EP4 donde se observa una disminución significativa ($P < 0,05$) de la expresión relativa para cualquiera de los tratamientos dietéticos ensayados (Figura 60.B). En la expresión relativa del gen DELTA6 también se observa una tendencia a la sub-expresión en casi todos los animales, tanto estresados como no estresados, para todas las dietas en relación a la dieta 100FO, a excepción de la dieta 100LO en peces no estresados (Figura 60.B).

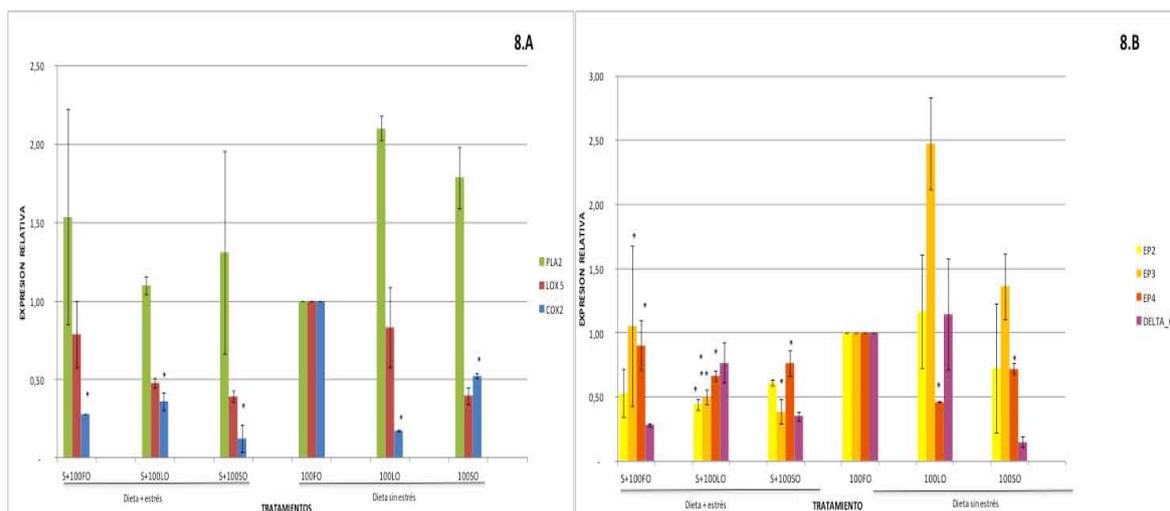


Figura 60. Expresión relativa de genes relacionados con la cascada de eicosanoides en intestino de *Solea senegalensis* alimentado con dietas con distintos tipos de aceites y/o sometidos a estrés de persecución. Diferentes letras en cada gráfica representan diferencias significativas ($P < 0.05$). A) Fosfolipasa A2 (PLA2); Lipooxigenasa 5 (LOX5); Ciclooxygenasa 2 (COX2). B) Receptores de eicosanoides: EP2, EP3, EP4. Delta-6 desaturasa.

En el hígado, no se encontraron diferencias significativas para la expresión relativa de los genes LOX5 y PLA2 en las dietas experimentales, pero los animales estresados alimentados con la dieta 100FO, que mostraron un aumento

significativo ($P < 0,05$) en la expresión relativa del gen LOX5 en comparación con los peces alimentados con esa misma dieta en condiciones no estresantes, mientras que la expresión relativa del gen PLA2 en relación a esta dieta muestra por el contrario una disminución significativa ($P < 0,05$). (Figura 61.A). La expresión relativa de la COX2 está significativamente ($P < 0,05$) incrementada en peces alimentados con la dieta 100F y sometidos a estrés (Figura 61.A).

Los aceites de la dieta no afectaron significativamente la expresión relativa de los genes EP2 y EP3 en el hígado (Figura 61.B), pero existe una tendencia a la disminución en la expresión relativa del gen EP2 para todas las dietas probadas bajo situaciones de estrés con respecto a la dieta 100FO, mientras que el expresión relativa del gen EP3 sigue las mismas pautas a excepción de la dieta LO, que tiende a aumentar (Figura 61.B). Sin embargo, tanto la expresión relativa del gen EP4 como la del gen DELTA6 en los peces estresados alimentados con la dieta 100SO se reduce significativamente ($P < 0,05$) cuando lo comparamos con la dieta 100FO, en ausencia de estrés (Figura 61.B).

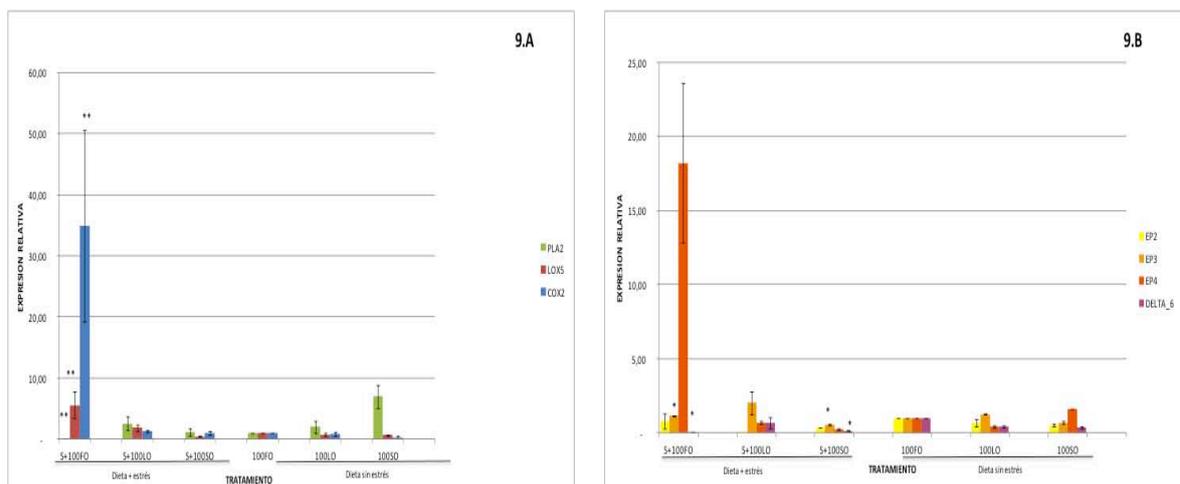


Figura 61. Expresión relativa de genes relacionados con la cascada de eicosanoides en hígado de *Solea senegalensis* alimentado con dietas con distintos tipos de aceites y/o sometidos a estrés de persecución. Diferentes letras en cada gráfica representan diferencias significativas ($P < 0,05$). A) Fosfolipasa A2 (PLA2); Lipooxigenasa 5 (LOX5); Ciclooxygenasa 2 (COX2). B) Receptores de eicosanoides: EP2, EP3, EP4. Delta-6 desaturasa

En la expresión relativa del gen COX-2 en músculo, no se encontraron resultados significativos entre la dieta y el estrés, pero si entre animales estresados y no estresados, observando una tendencia a la sobre-expresión relativa del gen COX2 en animales estresados y no estresados para cualquiera de las dietas experimentales con respecto a la dieta 100FO en peces no estresados. (Figura 62.A). No se obtuvieron diferencias significativas ni con la dieta ni con el estresante sobre la expresión relativa del gen de delta-6 desaturasa. Además, los peces estresados alimentados con dietas de VO mostraron valores mayores ($P < 0,05$) en la expresión relativa del gen EP2 con respecto a la dieta 100FO (Figura 62.A) y el resto de dietas tanto en animales estresados como en no estresados mostraron una tendencia a relativa a sobre-expresar el gen EP2 sobre la dieta 100FO en peces no estresados.

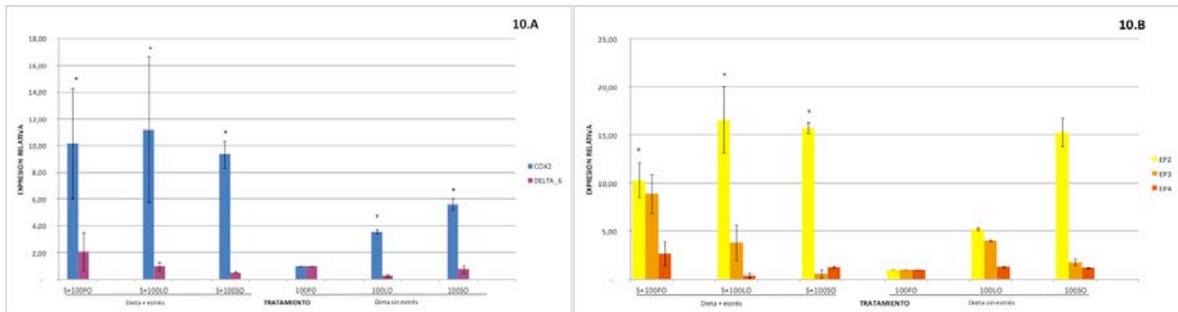


Figura 62. Expresión relativa de genes relacionados con la cascada de eicosanoides en músculo de *Solea senegalensis* alimentado con dietas con distintos tipos de aceites y/o sometidos a estrés de persecución. Diferentes letras en cada gráfica representan diferencias significativas ($P < 0.05$). A) Ciclooxygenasa 2 (COX2), Delta-6 desaturasa. B) Receptores de eicosanoides: EP2, EP3, EP4.

A nivel histológico, se puede observar que los animales alimentados con las dietas basadas en aceites vegetales presentaron acúmulos lipídicos en hígado (Figura 63.A) y principalmente en intestino (Figura 63.B) con alta cantidad de acúmulos de lípidos en los enterocitos (Figura 63.B).

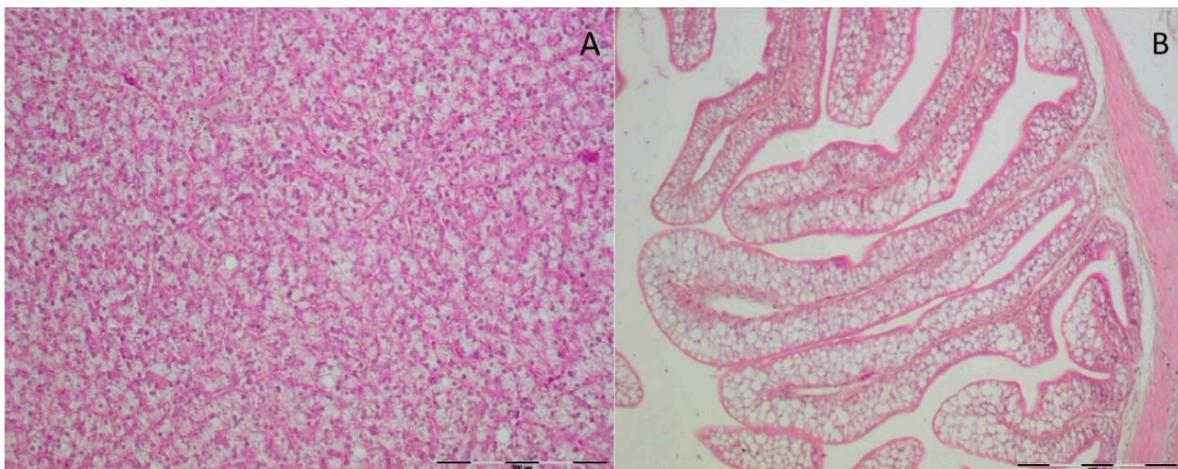


Figura 63. Morfología de hígado e intestino de *Solea senegalensis*. Alimentado con dietas con aceites vegetales. A) Hígado. B) Intestino.

En experimentos complementarios para la evaluación de dietas basadas en proteínas vegetales con un porcentaje de sustitución de harina de pescado del 78% y con un contenido proteico de 57% y dos niveles de lípidos: 9 (PP-9) y 18% (PP-18), se encontraron diferencias significativas de crecimiento entre los juveniles de lenguado alimentados con la dieta comercial ($63,65 \pm 6,17g$) y los peces alimentados con PP-18 ($46,98 \pm 1,67g$). El crecimiento de los peces alimentados con PP-9 ($53,67 \pm 1,10g$) fue ligeramente más alto que el de los alimentados con PP-18 (Figura 64). El nivel de lípidos totales en el músculo de los juveniles alimentados con la dieta comercial fue significativamente más alto (2,94% del peso fresco), que el de los juveniles alimentados con las dietas vegetales (1,58-1,84% del peso fresco). El contenido en lípidos de la dieta no parece afectar a la deposición lipídica en el músculo de los ejemplares. Sin embargo, el hígado mostró la tendencia contraria, con los valores más altos en los

juveniles alimentados con las dietas vegetales (11,85-13,64% del peso fresco), que con la dieta comercial (9,23% del peso fresco). Los niveles de proteínas al final del experimento no presentan diferencias significativas en los ejemplares alimentados con las diferentes dietas.

Las dietas experimentales fueron también ensayadas en sistemas de recirculación de agua, en los que la fluctuación de la calidad de esta fue mucho menor que la de los cultivos realizados en circuito abierto. El crecimiento del lenguado fue mucho más rápido utilizando sistemas de recirculación de agua. La estabilidad en la calidad del agua y la temperatura constante, son dos factores muy importantes para optimizar el rendimiento de las instalaciones del cultivo de lenguado.

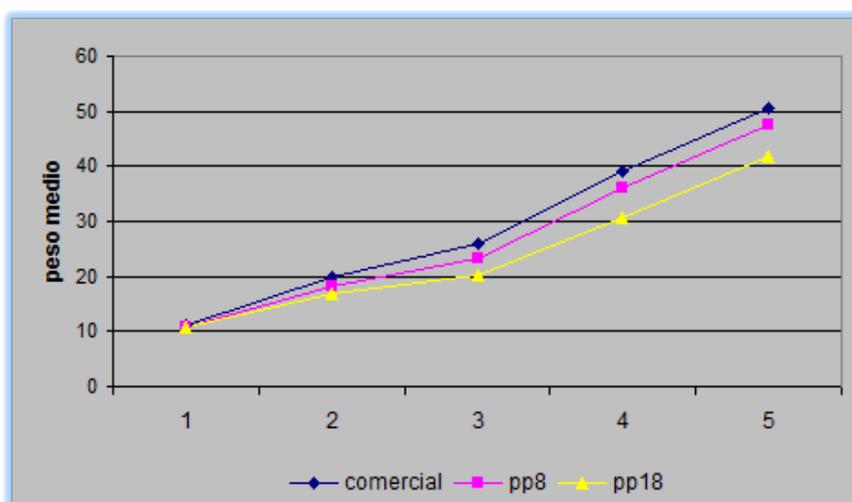


Figura 64. Engorde de juveniles de lenguado senegalés con tres dietas isoprotéicas con diferente composición lipídica (pienso comercial de la casa Skretting, y 8 y 18% de lípidos).

Efecto del choque térmico sobre la respuesta a estrés en juveniles de *Solea senegalensis*.

La elevada sensibilidad del lenguado senegalés frente a cambios de temperatura del agua recomendaba evaluar el efecto del choque térmico sobre su respuesta de estrés y su capacidad de adaptación frente a la elevación de temperatura, estudiando la expresión de diferentes genes relacionados con la respuesta de estrés y con la cascada de eicosanoides en distintos tejidos.

A nivel intestinal, el incremento de temperatura provoca un aumento significativo ($P < 0.05$) de la expresión relativa de los genes asociados a los receptores de glucocorticoides (GR1, GR2) y de HSP90B después de una semana de haberse iniciado el shock térmico (Figura 65.A, 65.B y 65.E). El incremento de temperatura no indujo ningún cambio significativo de la expresión de estos genes durante los primeros días de aclimatación al cambio de temperatura en el intestino de los peces experimentales ni tampoco tras una semana en los genes HSP70 y HSP90A (Figura 65.C y 65.D).

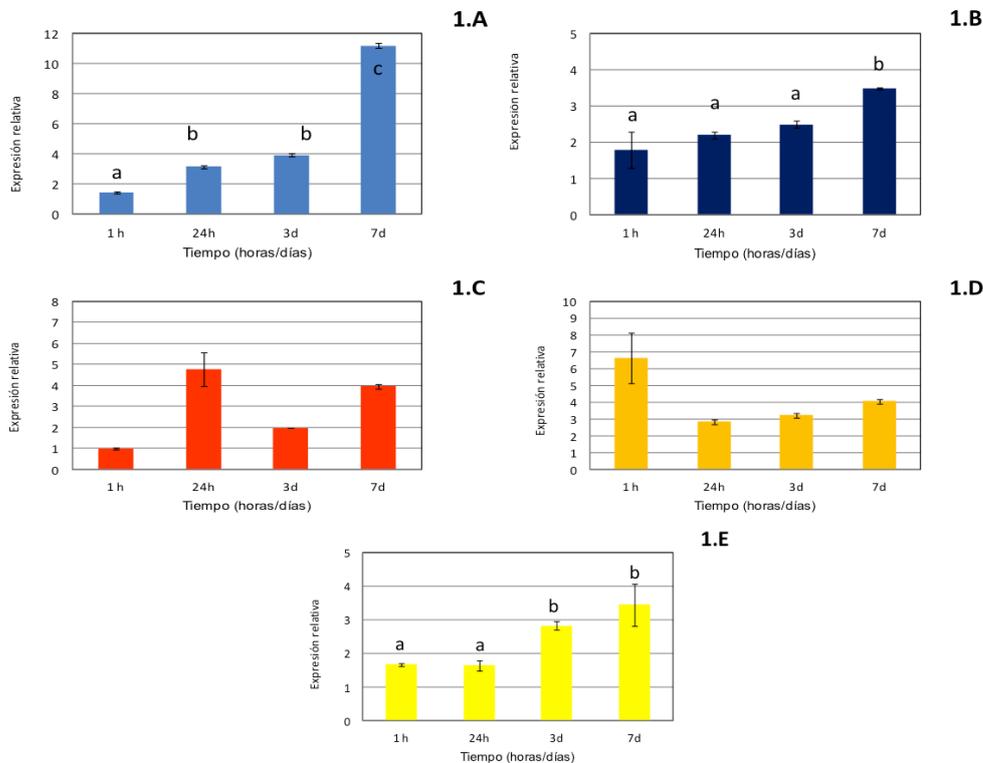


Figura 65. Expresión relativa de genes relacionados con la respuesta de estrés en intestino de *Solea senegalensis* sometido a un incremento de temperatura. Diferentes letras en cada gráfica representan diferencias significativas ($P < 0.05$). A) Receptor de Glucocorticoides 1 (GR1); B) Receptor de Glucocorticoides 2 (GR2); C) HSP70; D) HSP90A; E) HSP90B.

La expresión relativa del GR1 (Figura 66.A) y GR2 (Figura 66.B) en hígado aumenta significativamente ($P < 0.05$) 1 hora después de haberse iniciado el shock térmico. Los valores de expresión relativa de GR1 van disminuyendo progresivamente hasta 3 días después del cambio de temperatura, donde ya se mantienen estables hasta 7 días. El GR2 presenta una tendencia similar, aunque los valores entre 3 días y 7 días sí fueron significativamente diferentes. El incremento de temperatura no produjo variaciones en la expresión relativa de la HSP70 en hígado, aunque presenta una evolución semejante a GR1 en el tiempo, con disminución progresiva de valores (Figura 66.C). La expresión relativa de HSP90A (Figura 66.D), HSP90B (Figura 66.E) presentaron un valor significativamente ($P < 0.05$) mayor a las 24 h del comienzo del estrés. Con respecto a los genes relacionados con la cascada de eicosanoides, el incremento de temperatura produjo un valor máximo ($P < 0.05$) de expresión relativa de la COX2 (Figura 66.F) a las 24 horas del comienzo del estrés, aconteciendo lo contrario para la expresión relativa de la DELTA 6 (Figura 66.G), donde el menor ($P < 0.05$) valor se observó a las 24 horas. Con respecto a la expresión relativa de los receptores de eicosanoides, el aumento de temperatura incrementa ($P < 0.05$) la expresión relativa del EP2 (Figura 66.H) al cabo de una semana, mientras que la expresión relativa del EP4 (Figura 66.I) aumentó significativamente ($P < 0.05$) desde el tercer día.

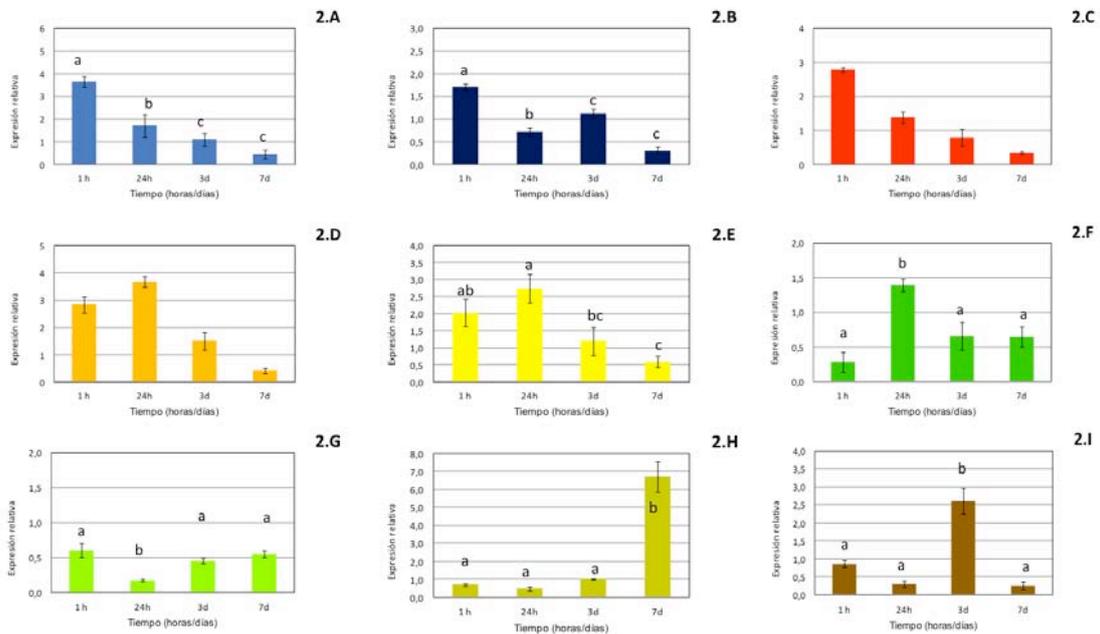


Figura 66. Expresión relativa de genes relacionados con la respuesta de estrés y con la cascada de eicosanoides en hígado de *Solea senegalensis* sometido a un incremento de temperatura. Diferentes letras en cada gráfica representan diferencias significativas ($P < 0.05$). A) Receptor de Glucocorticoides 1 (GR1); B) Receptor de Glucocorticoides 2 (GR2); C) HSP70; D) HSP90A; E) HSP90B. F) COX2; G) Delta 6 desaturasa; H) EP2; I) EP4.

El incremento de temperatura no produjo efecto sobre la expresión relativa del GR1 en el músculo (Figura 67.A). Sin embargo, la expresión relativa del GR2 alcanzó su mayor valor ($P < 0.05$) el tercer día post-estrés, recuperando los valores iniciales a la semana de la aclimatación a elevación de temperatura (Figura 67.B). No hay efectos de la elevación de la temperatura sobre la expresión de HSP70 en músculo (Figura 67.C). Sin embargo, el gen de la HSP90A se encuentra sub-expresado ($P < 0.05$) 1 hora después del shock térmico (Figura 67.D), mientras que la expresión de HSP90B se encuentra aumentada ($P < 0.05$) después de una semana de aclimatación al cambio de temperatura (Figura 67.E).

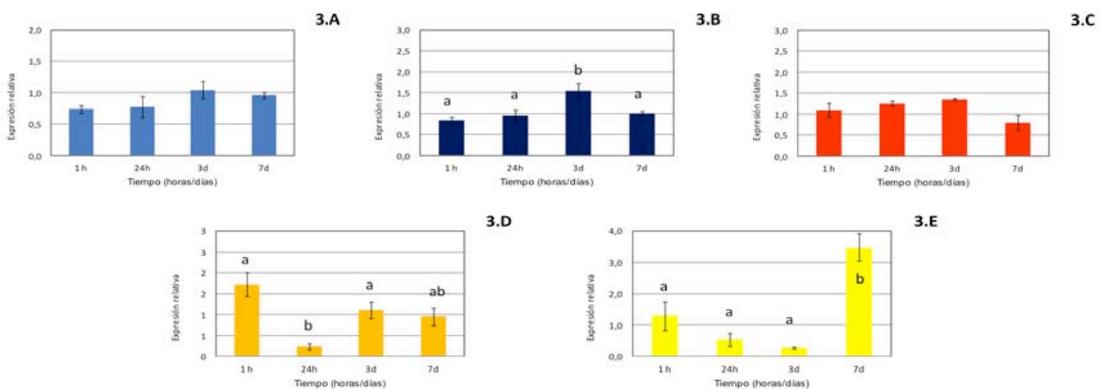


Figura 67. Expresión relativa de genes relacionados con la respuesta de estrés en músculo de *Solea senegalensis* sometido a un incremento de temperatura. Diferentes letras en cada gráfica representan diferencias significativas ($P < 0.05$). A) Receptor de Glucocorticoides 1 (GR1); B) Receptor de Glucocorticoides 2 (GR2); C) HSP70; D) HSP90A; E) HSP90B.

El incremento de temperatura indujo un incremento significativo ($P < 0.05$) en la expresión relativa del GR1 (Figura 68.A) y GR2 (Figura 68.B) en el cerebro a las 24 horas, recuperándose los valores iniciales a los 3 días de aclimatación. No hubo un efecto del incremento de temperatura en la expresión de HSP70, aunque presentó una tendencia a disminuir desde valores muy elevados tras 1 h de aclimatación al cambio de temperatura (Figura 68.C). Esta tendencia es semejante a la evolución que presenta la expresión relativa de HSP90A cuyo valor máximo ($P < 0.05$) de expresión relativa es 1 hora tras iniciarse el shock térmico, disminuyendo desde este elevado valor con posterioridad (Figura 68.D). El cambio de temperatura indujo una disminución significativa ($P < 0.05$) de la expresión de HSP90B después de 3 días, manteniéndose este valor disminuido después de una semana de aclimatación a la nueva temperatura (Figura 68.E).

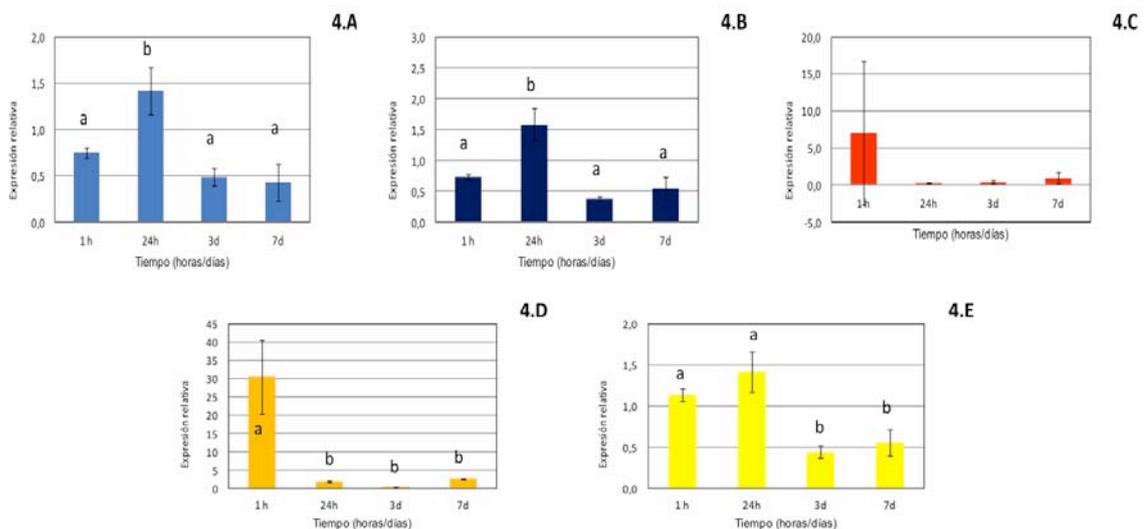


Figura 68. Expresión relativa de genes relacionados con la respuesta de estrés en cerebro de *Solea senegalensis* sometido a un incremento de temperatura. Diferentes letras en cada gráfica representan diferencias significativas ($P < 0.05$). A) Receptor de Glucocorticoides 1 (GR1); B) Receptor de Glucocorticoides 2 (GR2); C) HSP70; D) HSP90A; E) HSP90B.

El incremento de temperatura produjo un aumento significativo ($P < 0.05$) de la expresión relativa del GR1 en branquias a las 24 horas. A partir de este momento, el valor de expresión recuperó los valores iniciales, para volver a incrementar significativamente a los 7 días de aclimatación al cambio de temperatura (Figura 69.A). la expresión relativa del GR2 también presenta una elevación significativa ($P < 0.05$) tras 7 días de aclimatación al cambio de temperatura (Figura 69.B). El efecto del cambio de temperatura a las 24 h se puede observar también en la expresión relativa de HSP70 y HSP90A, donde se observa un incremento significativo ($P < 0.05$) de la expresión relativa de estos genes a las 24 horas de la aclimatación al cambio de temperatura, recuperando los valores iniciales con posterioridad (Figura 69.C y 69.D, respectivamente). El cambio de temperatura provoca un incremento significativo ($P < 0.05$) progresivo de la expresión relativa de HSP90B (Figura 69.E).

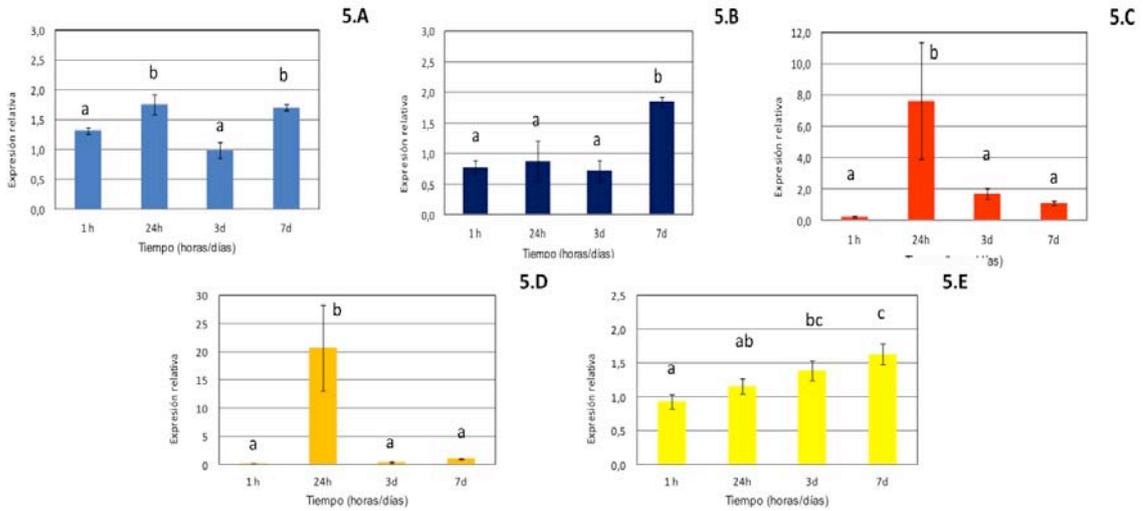


Figura 69. Expresión relativa de genes relacionados con la respuesta de estrés en branquia de *Solea senegalensis* sometido a un incremento de temperatura. Diferentes letras en cada gráfica representan diferencias significativas ($P < 0.05$). A) Receptor de Glucocorticoides 1 (GR1); B) Receptor de Glucocorticoides 2 (GR2); C) HSP70; D) HSP90A; E) HSP90B.

Histológicamente, se observa que los animales aclimatados a 18°C presentan un aspecto normal, con morfología de enterocitos y hepatocitos semejante a los peces de acuicultura, con acúmulos supranucleares de lípidos en los enterocitos (Figura 70. A,C). Los peces aclimatados a altas temperaturas presentaron una morfología diferente de los peces control, con disminución de los contenidos lipídicos de hepatocitos y ausencia de vacuolas supranucleares de absorción lipídica en los enterocitos (Figura 70. B,D).

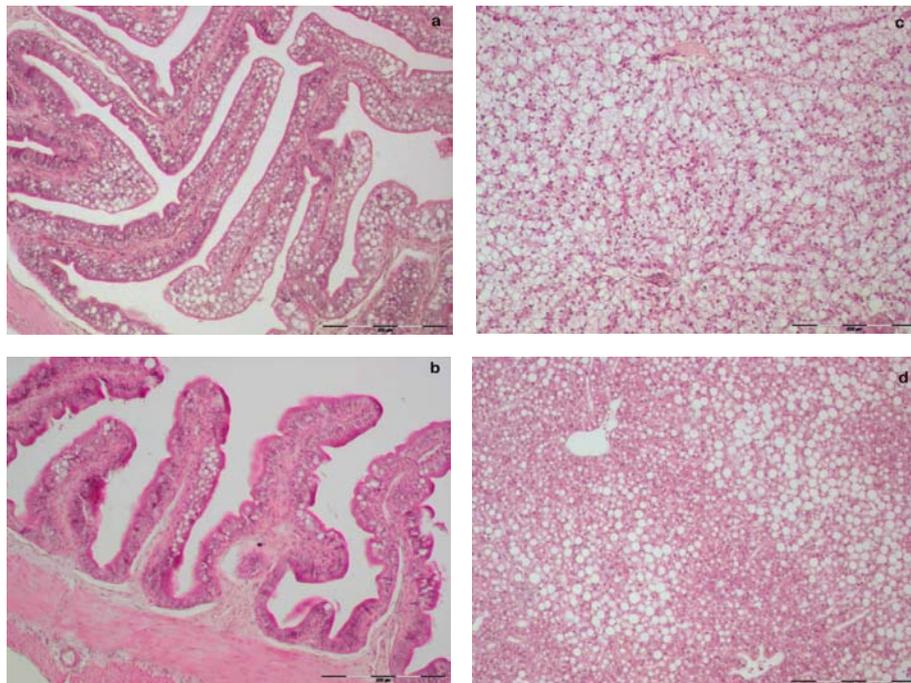


Figura 70. Morfología de intestino e hígado de *Solea senegalensis* tras una semana de aclimatación a incremento de temperatura. a) Intestino de pez control (18°C). b) Intestino de pez aclimatado (24°C). c) Hígado de pez control (18°C). d) Hígado de pez aclimatado (24°C).

Comportamiento y crecimiento de juveniles de *Solea senegalensis* alimentados con dietas suplementadas con atractantes.

Una reprogramación de los trabajos, después una sugerencia del sector productor canario, llevó a la ejecución de experimentos para averiguar la modulación del crecimiento y comportamiento mediante el uso de atractantes en la dieta. No hubo diferencias significativas de crecimiento, incluida la dispersión de talla y peso, tras el uso de dietas que incluyeron un 0,5% de aromas de bivalvo, almeja o poliqueto.

El índice de aceptación del alimento fue satisfactorios para todos los piensos evaluados (nunca próximos a 0), aunque en ningún caso se obtiene valores demasiado elevados (cercanos a 1). De los tres piensos con atractantes destaca el pienso que contiene aroma de gamba, cuyo índice de aceptación global es de 2,11, frente a los otros piensos en los cuales el índice de aceptación global no alcanza el valor 2 (Figura 71). Si ordenamos por índice de aceptación global los cuatro piensos, el pienso con aroma de gamba ocupa el primer lugar, seguido a distancia por el pienso control, el siguiente es el pienso que contiene aroma de poliqueto y el pienso con menor valor de índice de aceptación global obtenido es el pienso con aroma de bivalvo. Estos dos últimos presentaron un índice de aceptación global similar (la diferencia entre ellos es de 0,04). Recordemos que un pienso presenta una aceptación muy buena por parte de los peces cuando el índice de aceptación global se aproxima al valor de 3, mientras que el mejor valor obtenido en nuestro experimento alcanza el valor de 2,11.

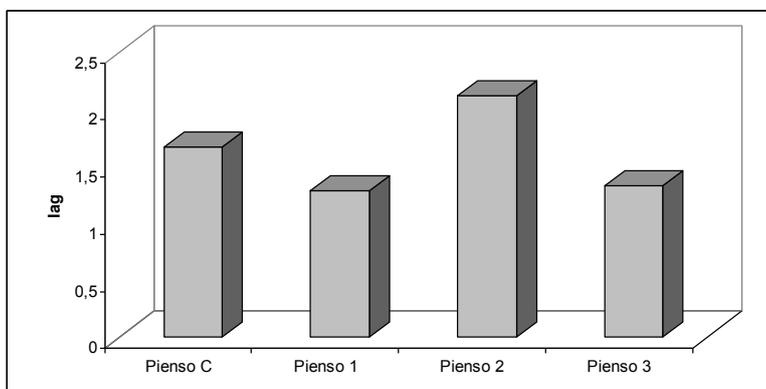


Figura 71. Índice de aceptación global (lag) para piensos con diferentes atractantes.

Influencia del sistema de producción sobre la expresión de genes del sistema inmune innato.

La comparación de los niveles de expresión de genes del sistema inmune innato se efectuó entre juveniles de lenguado que fueron cultivados de manera intensiva y extensiva. Después de 196 días de cultivo, la supervivencia media fue 12,7% y del 89% para los sistemas extensivo e intensivo, respectivamente. Los pesos medios se representa en la figura 72.

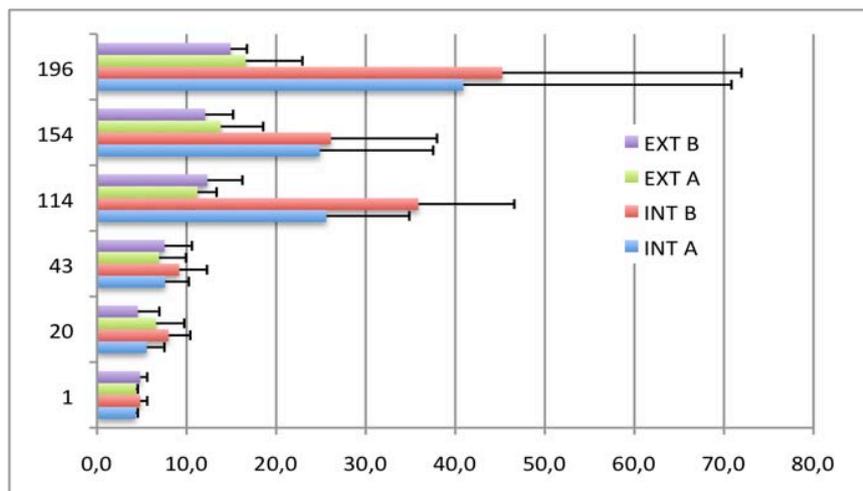


Figura 72: Crecimiento de lenguados en extensivo (EXT) e intensivo (INT). A y B indican animales no vacunados y vacunados frente a PDP, respectivamente.

Los niveles de ARN mensajero de la lisozima g, hepcidina y C3 en el riñón de ejemplares cultivados bajo ambos sistemas después de los 196 días de cultivo fueron inferiores, aunque con diferencias temporales, en el sistema intensivo. En el caso de la lisozima g, los ARN mensajeros se redujeron 2,3 veces en el sistema intensivo en Mayo (Figura 73). Para la *hamp1*, sus niveles de expresión disminuyeron significativamente 3, 2 y 1,8 veces en Mayo, Octubre y Noviembre, respectivamente en las muestras de intensivo. Para C3, los niveles de expresión disminuyeron en las muestras de intensivo de Agosto (2,5 veces), Octubre (4,7 veces) y Noviembre (aunque no significativamente).

Estos datos sugieren un efecto negativo de las condiciones de cultivo intensivo sobre algunos genes del sistema inmune innato. Si asociamos esta información al efecto de los corticoides y de la dexametasona obtenidos en experimentos anteriores y sus consecuencias en el estado de inmunocompetencia y susceptibilidad a patógenos, queda claro que es necesario una mejora de las condiciones de producción prestando un especial énfasis al mantenimiento de unos niveles adecuados de expresión de los genes que representan una primera barrera frente al ataque de patógenos.

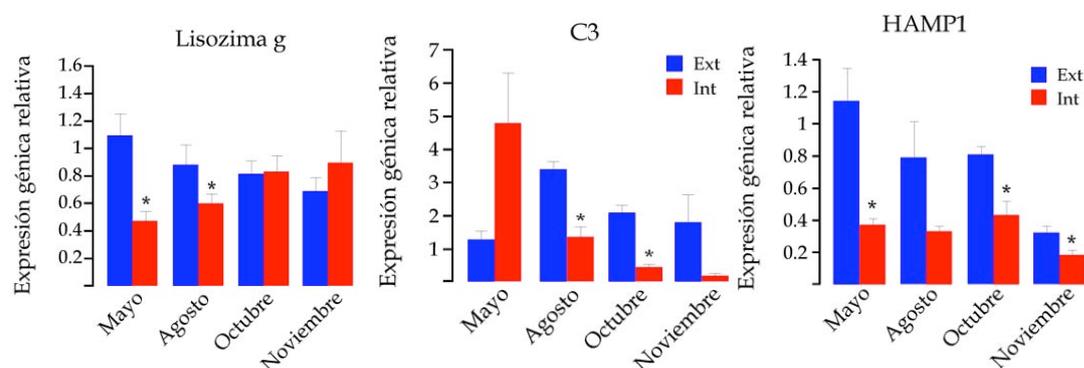


Figura 73: Expresión de lisozima g, *hamp1* y C3 en riñón cefálico bajo condiciones de cultivo extensivas e intensivas. Como calibrador se usó la muestra Ext Mayo. Valores con "*" son estadísticamente significativos.

2.4.2.3. Resultados para el objetivo B.3. Conseguir protocolos eficaces de prevención de enfermedades.

Análisis de las cepas bacterianas para acción prebiótica contra el patógeno *Vibrio harveyi*.

De las 343 cepas de bacterias aisladas, solo una cepa (S220) presentó un halo de inhibición contra el patógeno *V. harveyi*. Esta cepa fue aislada del riñón de un lenguado de los esteros del IFAPA Puerto de Santa María y está identificada como *Staphylococcus saprophyticus*.

Establecimiento del protocolo óptimo de incorporación del probiótico Pdp11 seleccionado (*Shewanella putrefaciens*) mediante dos formas de adición (fresco y liofilizado) en preengorde de lenguado senegalés.

Después de cultivar alevines de lenguado de 10.5 ± 4.5 g durante cuatro meses (dos con adición de probiótico y posteriormente dos con pienso control), no se observaron diferencias significativas ($p < 0.05$) en el crecimiento en longitud y peso en los ejemplares alimentados con las cuatro dietas estudiadas durante dos meses. La supervivencia fue del 100% en todos los grupos.

Los resultados de los análisis de metabolitos se exponen en las tablas XXIII, XXIV y XV. Como se puede observar existen diferencias significativas ($p < 0.05$) según las dietas suministradas, siendo especialmente relevantes los mayores niveles de glucógeno en hígado de los ejemplares alimentados con Pdp11 fresco y Pdp11 liofilizado frente al grupo control y control alginato. Este hecho supone una ventaja en la respuesta instantánea al estrés.

Tabla XXIII: Metabolitos en plasma de juveniles de lenguado senegalés alimentados con cuatro dietas diferentes

Grupo	Glucosa (mM)	Lactato (mM)	Proteínas (mg/mL)	Aminoácidos (mM)	Ácidos Grasos (mM)	Triglicéridos (mM)
Control	3.8 ± 0.3^b	0.66 ± 0.04^b	43.4 ± 1.4	19.1 ± 0.9	0.50 ± 0.07	11.2 ± 0.7^b
Pdp11F	5.1 ± 0.3^a	0.83 ± 0.05^a	39.0 ± 0.9	17.4 ± 1.0	0.54 ± 0.07	14.6 ± 0.9^a
Pdp11L	4.0 ± 0.3^b	$0.77 \pm 0.05^{a,b}$	41.9 ± 1.6	20.1 ± 1.1	0.54 ± 0.10	$12.5 \pm 0.8^{a,b}$

Tabla XXIV: Metabolitos en plasma de juveniles de lenguado senegalés alimentados con cuatro dietas diferentes

Grupo	Glucógeno (μ mol glc/g pf)	Glucosa (μ mol glc/g pf)	Triglicéridos (μ mol TAG/g pf)	Aminoácidos (μ mol aa/g pf)
Control	122.0 ± 6.3^c	17.7 ± 2.3	10.0 ± 0.4^c	28.6 ± 1.7
Pdp11F	215.7 ± 7.9^a	11.6 ± 1.2	13.2 ± 0.8^a	22.4 ± 1.5
Pdp11L	174.8 ± 8.2^b	9.2 ± 1.4	$12.9 \pm 0.8^{a,b}$	23.2 ± 1.2
Alginato	130.5 ± 6.7^c	14.0 ± 5.7	$10.4 \pm 0.4^{b,c}$	27.3 ± 2.2

Tabla XV: Metabolitos en músculo de juveniles de lenguado senegalés alimentados con cuatro dietas diferentes

Grupo	Glucógeno (μmol glc/g pf)	Glucosa (μmol glc/g pf)	Aminoácidos (μmol TAG/g pf)	Triglicéridos (μmol aa/g pf)	Lactato (μmol Lact/g pf)
Control	0.63±0.18	0.79±0.17 ^a	122.0±8.1 ^c	0.89±0.05	33.3±1.5 ^b
Pdp11F	0.68±0.15	1.21±0.16 ^b	170.8±9.0 ^a	0.99±0.06	40.6±1.9 ^a
Pdp11 L	0.60±0.12	1.79±0.11 ^c	157.2±9.2 ^{a,b}	0.95±0.06	40.2±1.6 ^a
Alginato	0.72±0.16	0.87±0.22 ^a	130.8±6.0 ^{b,c}	0.95±0.04	31.8±1.2 ^b

La mortalidad acumulada en la infección experimental con *Photobacterium damselae* subsp *piscicida* se presenta en la figura 74. Los ejemplares alimentados con Pdp11 fresco mostraron una RPS (Porcentaje relativo de supervivencia) de un 21.4% mientras que los grupos Pdp11 liofilizado y alginato fueron similares al control.

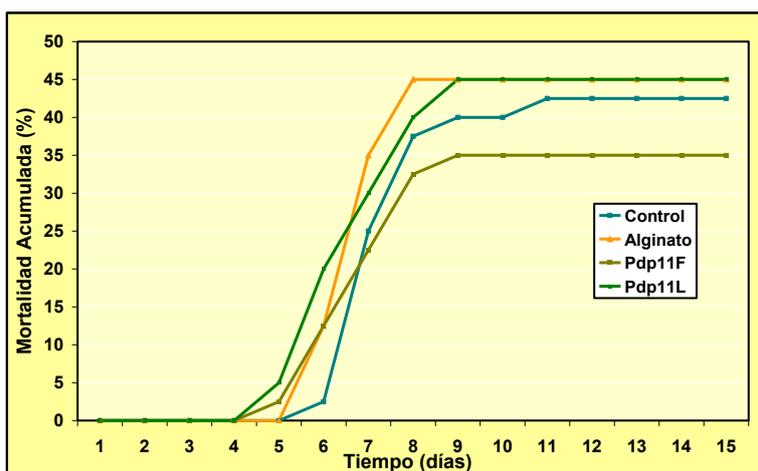


Figura 74. Mortalidad acumulada (%) en juveniles de lenguado senegalés tras infección experimental (i.p.) con *Photobacterium damselae* subsp *piscicida*

El análisis de la microbiota digestiva (DGGE) tras dos meses de suministro de probiótico mostró una homogeneidad significativamente superior ($p < 0.05$) en los juveniles alimentados con Pdp11 liofilizado (100%) y gran homogeneidad en los ejemplares que recibieron alginato (95%) y Pdp11 fresco (80%). Mientras que en los controles se observó una menor similitud (60%) entre ejemplares (Figura 75).



Figura 75. Patrones de bandas de microbiota digestiva (DGGE) de alevines alimentados con las cuatro dietas ensayadas durante dos meses.

El análisis de la microbiota digestiva (DGGE) tras un mes de interrupción del suministro de probiótico mostró una reducción en la homogeneidad entre ejemplares, con valores de 75% para los juveniles alimentados con Pdp11 liofilizado y alginato y 50% para el grupo Pdp11 fresco y control (Figura 76).

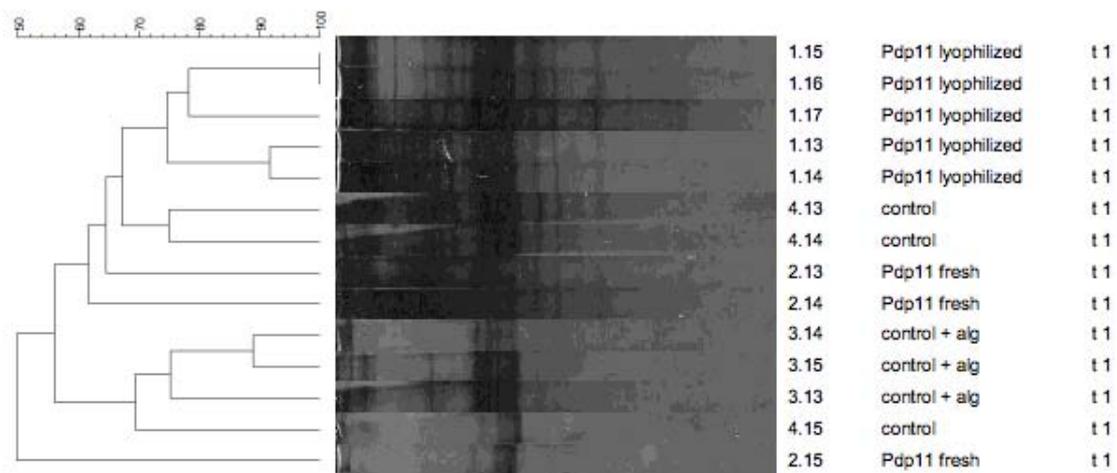


Figura 76. Patrones de bandas de microbiota digestiva (DGGE) de alevines alimentados con las cuatro dietas ensayadas tras un mes de interrupción del suministro.

En relación a los parámetros inmunológicos, la actividad lisozima ensayada en sueros de los ejemplares alimentados con las cuatro dietas estudiadas (Pdp11 fresco, liofilizado, control y alginato) mostró una gran dispersión en cualquiera de los tiempos analizados (Figura 77), por lo que no se detectaron diferencias significativas.

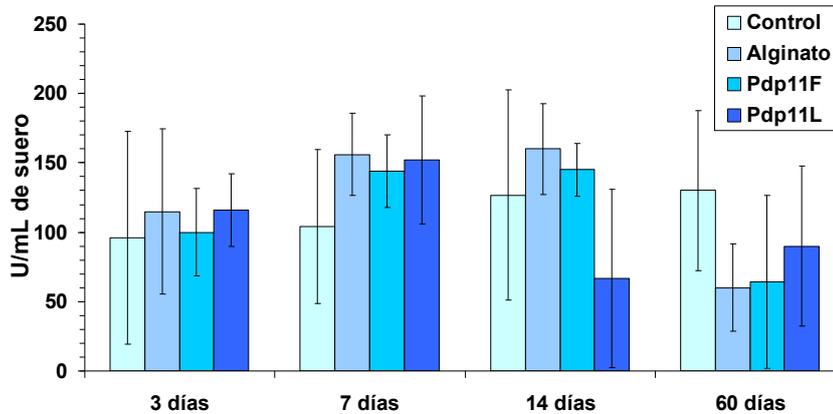


Figura 77. Actividad lisozima (en Unidades/min por cada mL de suero) detectada en sueros de peces alimentados con la cepa Pdp11 fresca, liofilizada frente al control y control-alginato durante 3, 7, 14 y 60 días,

En cuanto al título de anticuerpos totales en suero (ELISA), no se observaron diferencias significativas en los ejemplares alimentados con las distintas dietas ensayadas (Figura 78).

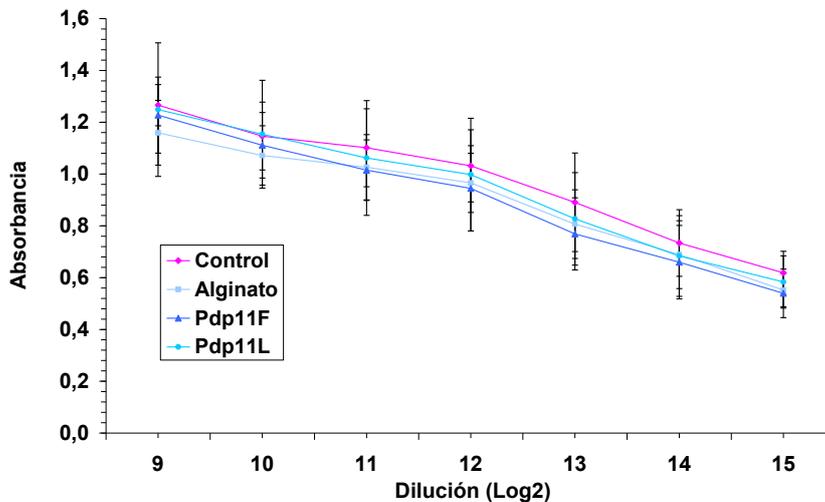


Figura 78. Medida de anticuerpos totales en sueros de lenguados mediante la técnica ELISA, utilizando distintas diluciones de suero de lenguados con dieta Pdp11 fresco, liofilizado, control y control- alginato.

En cuanto al título de anticuerpos específicos frente a Pdp11 (ELISA), no se observaron diferencias significativas en los ejemplares alimentados con las diferentes dietas ensayadas (Figura 79).

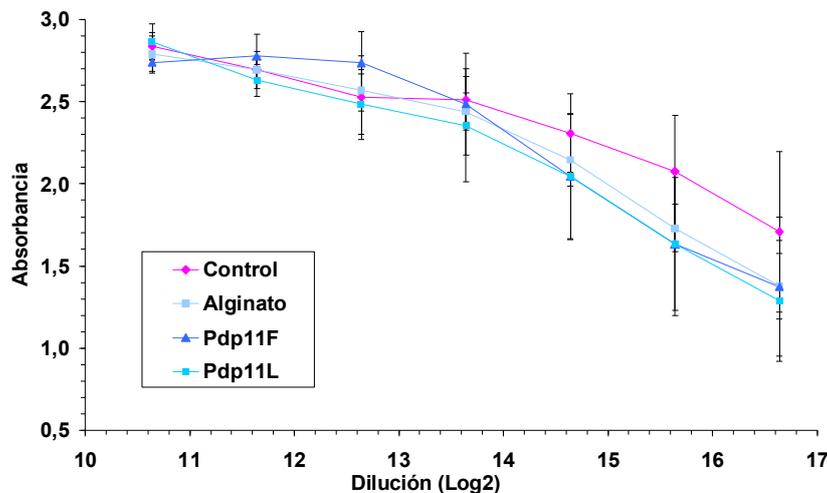


Figura 79. Valores de absorbancia obtenidos con distintas diluciones de sueros de lenguados mediante la técnica ELISA, utilizando como antígeno bacterina de la cepa Pdp11 y suero de lenguados con dieta con Pdp11 fresco, liofilizado, control y control- alginato.

Asimismo tampoco se detectaron diferencias en anticuerpos específicos frente a Pdp11 (Western-Blot) entre los peces alimentados con las diferentes dietas a lo largo de la experiencia (30 y 60 días). En la Figura 80, se observa el gel de electroforesis teñido con azul de Comassie, apreciándose la existencia de bandas protéicas en los distintos preparados de ECPs y OMPs procedentes de la cepa Pdp11.

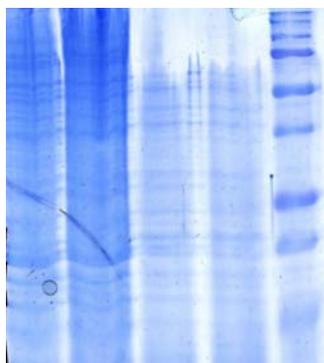


Figura 80. Gel de electroforesis teñida con azul de Comassie. De izquierda a derecha se pueden observar las siguientes bandas: 1 y 2 ECPs, 3 y 4 OMPs, 5 patrón de peso molecular.

La concentración de proteínas determinada en sueros de los ejemplares alimentados con las cuatro dietas experimentales (Pdp11 fresco, liofilizado, control y alginato) mostró una gran dispersión a lo largo del tiempo de estudio (Figura 81). Sin embargo, a día 7 se observaron valores significativamente mayores en suero de juveniles que recibieron la dieta Pdp11 liofilizado (74,4 mg/ml) frente a la dieta control (44,9mg/ml). Las dietas alginato y Pdp11 frescos presentaron valores mayores (81,1mg/ml, alginato; 83,8mg/ml, Pdp11 fresco) aunque no a nivel significativo ($P > 0,05$).

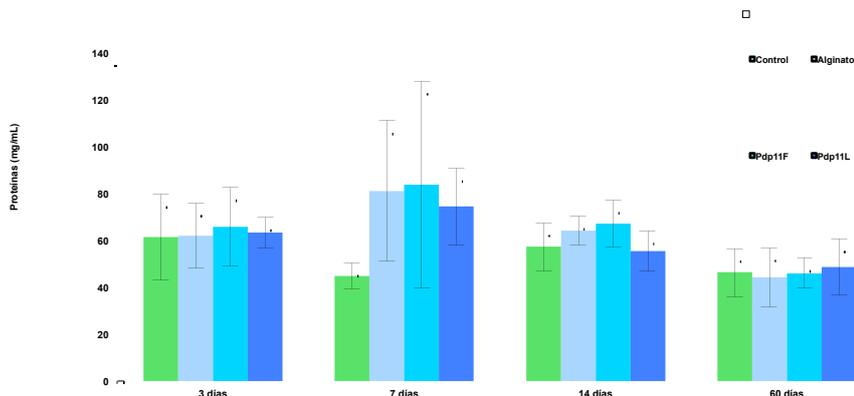


Figura 81. Medida de proteínas en suero de lenguados alimentados con dieta Pdp11 fresco, liofilizado, control y control- alginato.

El análisis de proteínas en 2D permitió obtener gran cantidad de información. Se realizaron 6 geles, cuyas manchas o spots fueron procesadas mediante análisis de imagen. Se seleccionaron entre todos los spots aquellos presentes en los tres geles realizados con el suero de peces alimentados con probióticos y que no aparecían en los sueros de los peces controles (Figura 82). Estas manchas, una vez extraídas de los geles se identificaron como dos fragmentos de transferrina y un precursor de la lipocalina (Tabla XXVI).

Tabla XXVI: Proteínas analizadas procedentes del suero de peces alimentados con el probiótico Pdp11.

PUNTO	PROTEÍNA	MASA	P. ISOELÉCTRICO
1	Transferrina 1	64,95 kd	5,38
2	Precursor de la lipocalina	56,23 kd	5,35
3	Transferrina 2	57,52 kd	5,89

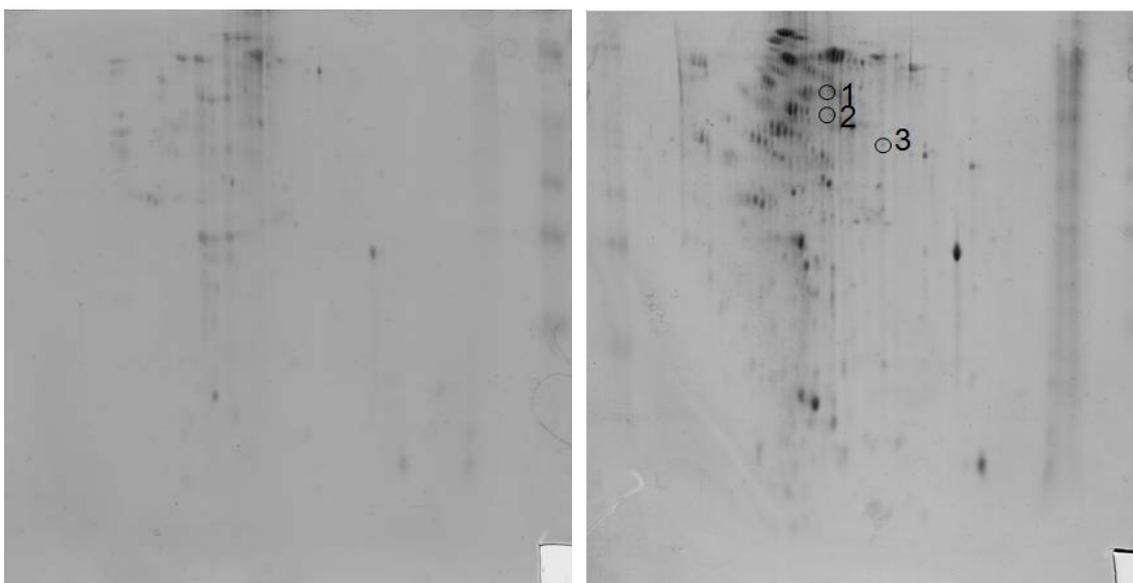


Figura 82. Electroforesis bidimensional de proteínas de sueros de peces controles (izquierda) y de proteína de peces alimentados con el probiótico Pdp11. 1: transferrina 1; 2: precursor de la lipocalina; 3: transferrina 2.

Es conocida la implicación de las transferrinas respecto a la captación de hierro libre. Dicha función está relacionada con mecanismos de prevención de anemias, así como el control de hierro residual, evitando la proliferación de bacterias patógenas y el daño celular. En peces, la transferrina ha sido también identificada como proteína de fase aguda, observándose niveles de expresión elevados en trucha arco iris tras infección bacteriana. Así mismo, fragmentos de transferrina son responsables de la activación de macrófagos en *Carassius auratus auratus* a pesar de que los mecanismos son aún desconocidos. Por tanto las transferrinas pueden considerarse un mecanismo de defensa natural frente a patógenos como ha sido observado en la estimulación de los macrófagos en cultivos de goldfish. La expresión de transferrinas en peces alimentados con probióticos podría explicar en parte la protección que confiere el probiótico Pdp11 frente a las infecciones experimentales con *P. damsela* susp. *piscicida*.

Por su parte las lipocalinas son un grupo de proteínas de amplia actividad biológica con funciones escasamente conocidas, entre las que se incluyen las relacionadas con el sistema inmune, unión de ligandos lipófilos y transporte de ácidos grasos, hormonas lipídicas y tiroideas, etc,. Se han observado diferencias de expresión de estas proteínas en procesos infecciosos. La ausencia de respuesta humoral específica respecto al aporte probiótico no descarta la estimulación local a nivel de la mucosa digestiva.

Influencia del probiótico Pdp11 sobre el estado inmune y capacidad de defensa durante el engorde de lenguado senegalés a baja y alta densidad

Después de siete días desde el inicio del tratamiento con ejemplares de 22.7 ± 1.6 g de peso, se observaron heridas en la superficie de varios ejemplares en los grupos cultivados en densidad alta de 21.7 Kg/m^2 (Figura 83). A los nueve días se inició la mortalidad, de mayor intensidad en los juveniles de ambos tanques control, como puede observarse en la Figura 84. El análisis de patógenos efectuado demostró la presencia de *Vibrio parahaemolyticus* y *Vibrio harveyi* y varias cepas pertenecientes al género *Vibrio sp.* La mortalidad alcanzada fue superior en el grupo control (43-85%) frente al que recibió probiótico en dieta (15-17%). Resaltar que las heridas de los ejemplares alimentados con Pdp11 remitieron de forma natural al cabo de 15 días.



Figura 83. Sintomatología de Vibriosis en juveniles de lenguado senegalés en engorde a alta densidad.

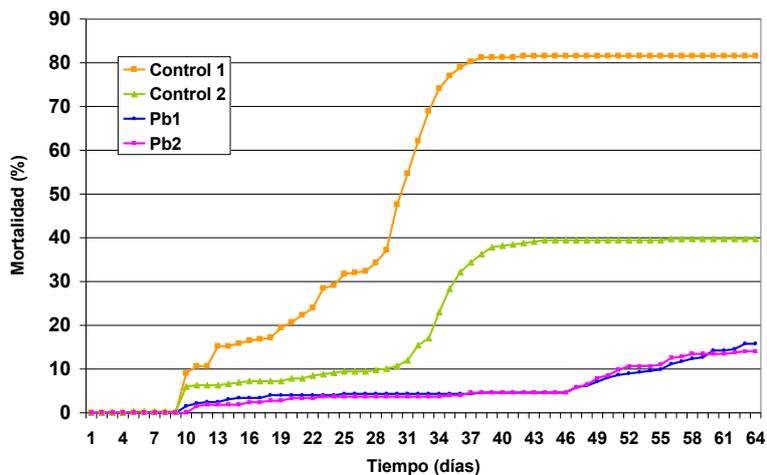


Figura 84: Evolución de la mortalidad (%) observada en lenguado senegalés alimentado con pienso control y adicionado con Pdp11 fresco (Pb1 y Pb2) en alta densidad de cultivo.

La infección experimental con *P. damsela* subsp. *piscicida* (ip) llevada a cabo con los ejemplares de lenguado senegalés cultivados a densidad baja, reveló protección frente al patógeno, (RPS 66.7%) respecto a los controles (Figura 85).

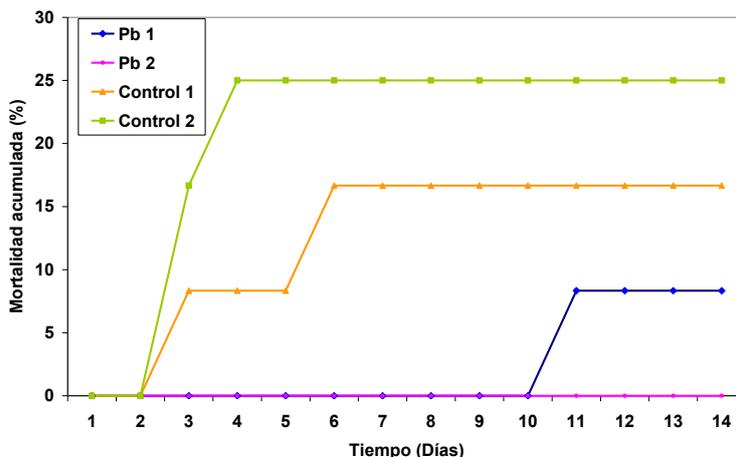


Figura 85. Mortalidad acumulada observada en ejemplares de lenguado senegalés cultivado en alta densidad a lo largo de la infección experimental con *P. damsela* subsp. *Piscicida*.

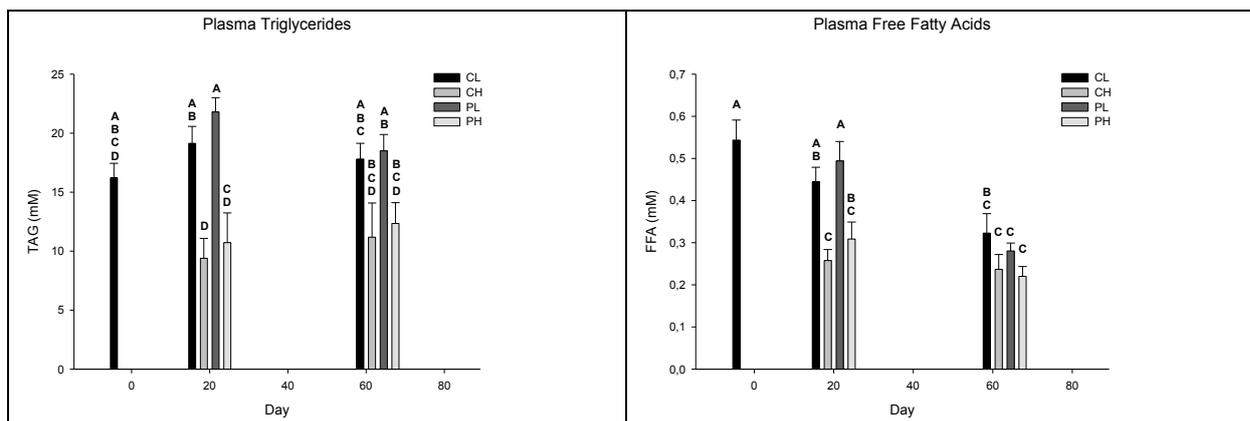
Las tasas de crecimiento específico se muestran en la Tabla XXVII. Como puede observar, no hubo crecimiento en los ejemplares mantenidos a alta densidad de cultivo. El mayor crecimiento registrado en el grupo control se debió al menor número de ejemplares que superaron la infección de vibriosis con respecto al grupo probiótico. En cuanto a los juveniles cultivados a baja densidad, el crecimiento fue significativamente mayor en el grupo control, dato éste que por el momento no hemos encontrado justificación alguna.

Tabla XXVII. Tasas de crecimiento de lenguado senegalés cultivado a densidad media y alta alimentado con un pienso control y adicionado de Pdp11. (Media \pm SEM). Diferentes letras significan diferencias significativas ($P < 0.05$). (* Los datos se refieren a un único duplicado).

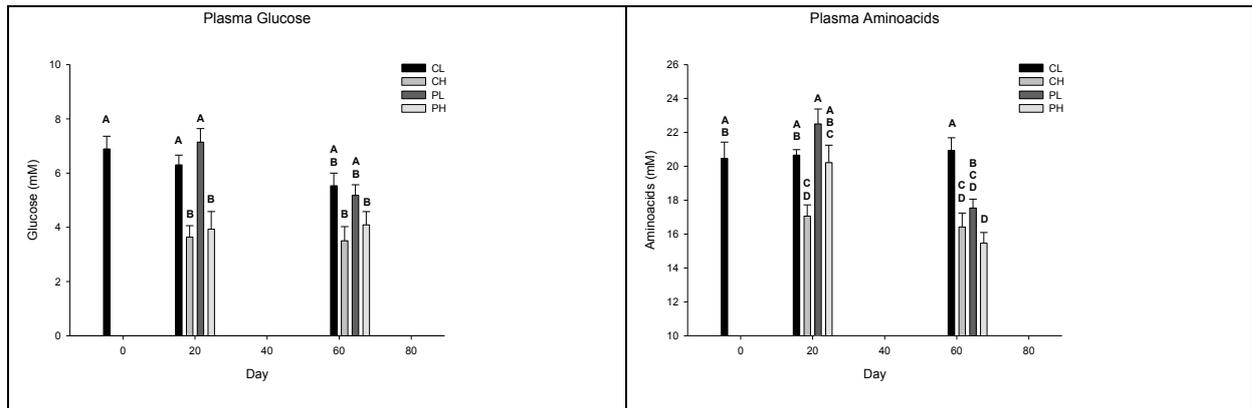
	Densidad media		Alta densidad	
	Dieta Control	Dieta Pdp11	Dieta Control	Dieta Pdp11
Peso inicial (g)	21,0 \pm 0.2	22,1 \pm 0.3	24,1 \pm 0.2	23,4 \pm 0.2
Peso a 30 días (g)	31,4 \pm 0.4	29,4 \pm 0.4	23,6 \pm 0.4*	22,7 \pm 0.2
Peso final (g)	40,2 \pm 0.6	34,2 \pm 0.6	26,4 \pm 0.5*	24,0 \pm 0.3
SGR (% día⁻¹)	1,05 \pm 0,02	0,71 \pm 0,05	0,17 *	0,04 \pm 0,01
Supervivencia final (%)	100,0 \pm 0,0	99,7 \pm 0,25	36,1 \pm 15.1	84,1 \pm 0.9

La mortalidad asociada a la infección natural experimentada por los ejemplares cultivados a alta densidad a 30 y 60 días produjo una reducción de 1/3 en la carga del grupo control con respecto al probiótico. Este hecho indudablemente repercutió en los valores de los parámetros metabólicos estudiados.

En todos los parámetros metabólicos analizados se observan niveles mayores a bajas densidades de cultivo, lo que indica un mejor estado fisiológico de los ejemplares. Asimismo, los ejemplares del grupo probiótico a baja densidad mostraron una tendencia, ya a día 21, a aumentar los niveles plasmáticos de distintos metabolitos (glucosa, triglicéridos, ácidos grasos y aminoácidos) frente al grupo control (Figuras 86, 87, 88 y 99; Tabla XXVIII). Los mayores niveles de triglicéridos y ácidos grasos registrados podrían estar relacionado con una mejor absorción y transporte lipídico ya observada en anteriores experiencia.



Figuras 86 y 87. Niveles plasmáticos de triglicéridos (mM) y ácidos grasos libres (mM) en juveniles de lenguado senegalés alimentados con pienso control (C) ó pienso enriquecido con probiótico (P) y mantenidos en condiciones de baja (L) o alta (H) densidad. (Media \pm SEM; N=6-12). Letras diferentes indican existencia de diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$).



Figuras 88 y 89. Niveles plasmáticos de glucosa (mM) y aminoácidos (mM) en juveniles de lenguado senegalés alimentados con pienso control (C) ó pienso enriquecido con probiótico (P) y mantenidos en baja (L) o alta (H) densidad. Datos presentados como media \pm SEM (N=6-12). Letras iguales indican no existencia de diferencias estadísticamente significativas ($p > 0.05$).

El cultivo a alta densidad indujo una clara situación de estrés, caracterizada por valores plasmáticos de cortisol ligeramente elevados, así como una tendencia a disminuir los niveles de metabolitos plasmáticos.

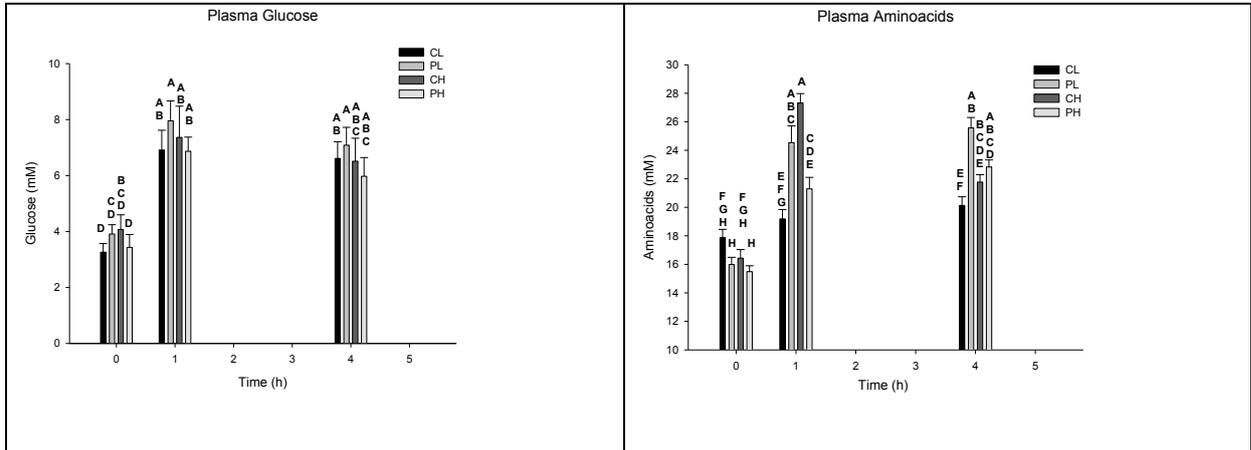
Los ejemplares alimentados con probiótico Pdp11F en alta densidad presentaron una atenuación en la disminución de los metabolitos plasmáticos respecto a lo observado en los ejemplares control y mejores valores de glucosa y aminoácidos libres en hígado en relación a aquellos del grupo control (Tabla XXVIII). Nuestros resultados coinciden con los obtenidos con la administración de Pdp11 en dieta de dorada.

Tabla XXVIII. Parámetros metabólicos en plasma e hígado en juveniles de *S. senegalensis* mantenidos durante dos meses en condiciones de densidad nedia (grupo control) y alta (grupo probiótico) de cultivo, sometidos a estrés agudo (exposición al aire) y alimentados con pienso control o con probiótico. Media \pm error estándar de la media (SEM). Análisis estadístico realizado mediante T-student previa comprobación de la normalidad mediante test de Shapiro-Wilk's. Diferencias entre grupos: * $p < 0.05$; ** $p < 0.005$.

Grupo	Plasma			Hígado	
	Glucosa (mM)	Osmolalidad (mOsm/kg)	Cortisol (ng/mL)	Glucosa (mg/g ph)	Amino ácidos (μ mol/g ph)
Control día 0 (21.7 Kg/m²)	6.9 \pm 0.5 a	245 \pm 4 ab	11.5 \pm 2.1 b	3.0 \pm 0.2	43.3 \pm 2.4 ab
Control día 63 (11.1 Kg/m²)	3.5 \pm 0.5 b	263 \pm 4 a	21.3 \pm 5.5 ab	2.3 \pm 0.3	33.6 \pm 2.5 b
Pdp 11 día 63 (15.6 Kg/m²)	4.1 \pm 0.5 b	241 \pm 5 b	26.5 \pm 5.0 a	3.0 \pm 0.3	55.1 \pm 4.3 a

Los resultados obtenidos para condiciones de estrés agudo indican que los ejemplares cultivados en condiciones de baja densidad y alimentados con pienso suplementado con Pdp11 muestran una mayor activación metabólica ante una situación de estrés agudo (exposición al aire) -Figuras 90 y 91-. Este hecho supone un beneficio para el ejemplar pues le permitirá superar con mayor

facilidad esta situación recuperando más rápidamente su homeostasis. Destacan los niveles de glucosa y aminoácidos que se incrementan significativamente (1 y 4 horas) en todos los grupos a raíz de la situación de estrés experimentada por los ejemplares. Asimismo, se observa una tendencia del grupo probiótico a mayor respuesta a densidad baja.



Figuras 90 y 91. Niveles plasmáticos de glucosa (mM) y aminoácidos (mM) en ejemplares de lenguado senegalés aclimatados a las siguientes condiciones experimentales: alimentados con pienso control (C) o pienso enriquecido con probiótico (P) y mantenidos en condiciones de baja (L) o alta (H) densidad durante 64 días y sometidos a exposición aérea durante 5 minutos a tiempo inicial 0. (Media±SEM; N=8-16). Letras diferentes indican existencia de diferencias estadísticamente significativas (p < 0.05).

La adición de probiótico Pdp11 produjo una homogenización de la microbiota digestiva (81%) ya a los 21 días del inicio del mismo con respecto al grupo control (63.5%). Este efecto sufre un retardo como consecuencia del cultivo en alta densidad. (Figuras 92 y 93).

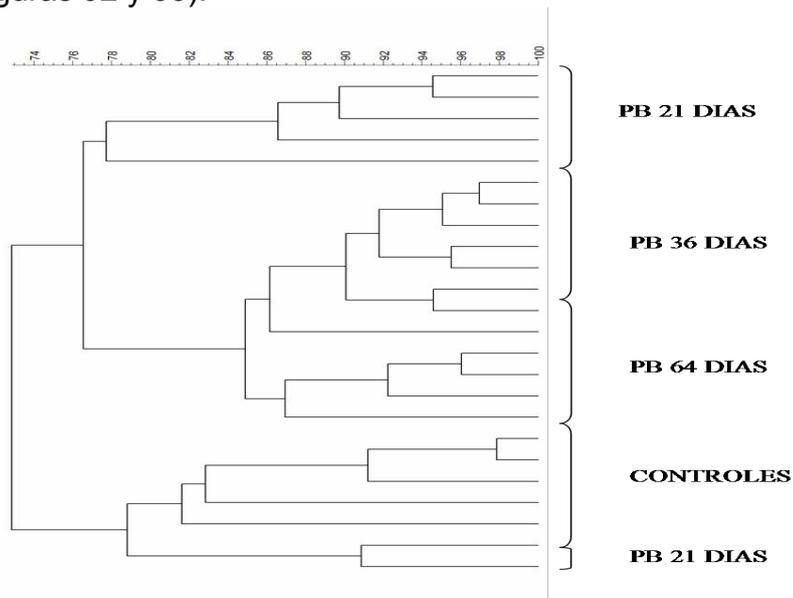


Figura 92. Índices de similitud (Pearson) de las de bandas de microbiota digestiva (DGGE) de juveniles de lenguado senegalés cultivados a alta densidad y alimentados con una dieta control y otra suplementada con Pdp11.

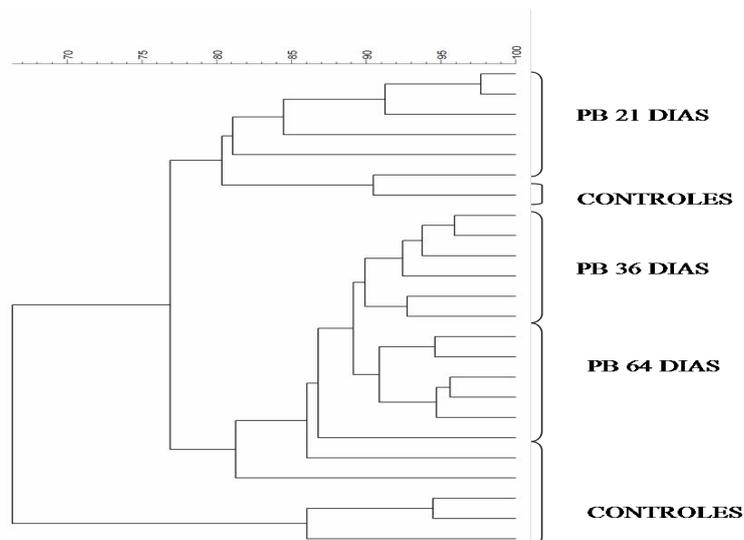


Figura 93. Índices de similitud (Pearson) de las bandas de microbiota digestiva (DGGE) de juveniles de lenguado senegalés cultivados a baja densidad y alimentados con una dieta control y otra suplementada con Pdp11.

En relación a los parámetros inmunológicos, la actividad lisozima en suero presentó una gran variabilidad entre ejemplares, no encontrándose diferencias significativas entre los dos grupos ensayados (control y Pdp11) sometidos tanto a estrés por alta densidad como a estrés agudo. La actividad antiproteasa en los sueros de los ejemplares disminuye en condiciones de alta densidad de cultivo. La adición de Pdp11 en dieta produce asimismo un descenso de esta actividad en condiciones de densidad baja. (Figura 94). Estos resultados sugieren la necesidad de aplicar pulsos de probiótico cortos.

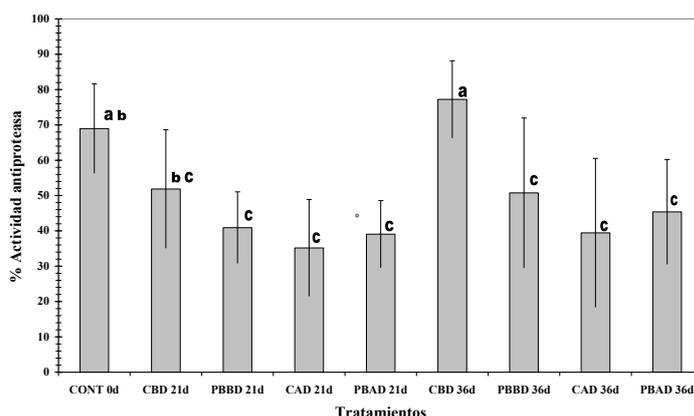


Figura 94. Actividad antiproteasa detectada en suero de peces alimentados con la dieta control a baja (CBD) y alta (CAD) densidad de cultivo y dieta suplementada con Pdp11 a baja (PBD) y alta (PBAD) densidad de cultivo a tiempo 0, 21 y 34 días tras el inicio de la adición probiótica.

Al aplicar posteriormente el estrés agudo también se observa una tendencia a menores valores en el grupo probiótico con respecto al control a baja densidad (Figura 95). Decir que los efectos de la aplicación del estrés agudo sobre el grupo control a alta densidad no pudieron ser evaluados debido a la alta mortalidad registrada.

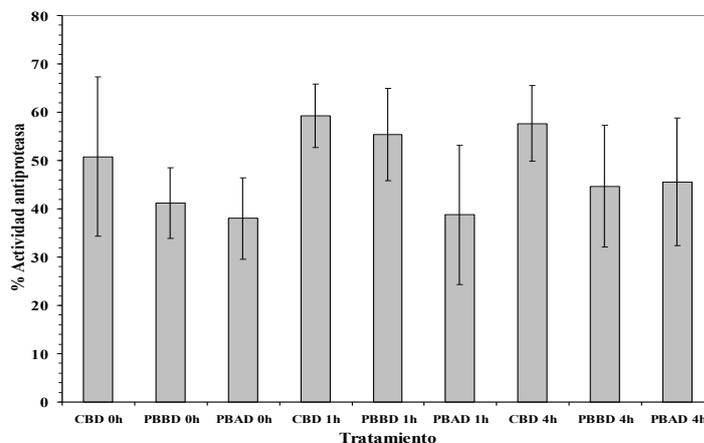


Figura 95. Actividad antiproteasa detectada en suero de peces alimentados con la dieta control a baja densidad de cultivo (CBD), y dieta suplementada con Pdp11 a baja (PBD) y alta (PBAD) densidad de cultivo a 0, 1 y 4 horas tras ser sometidos a estrés agudo

Influencia del probiótico Pdp11 sobre el estado inmune y capacidad de defensa en engorde de lenguado senegalés cultivado a alta densidad y sometido a estrés agudo continuado durante 15 días.

El experimento consistió cultivar durante 45 días dos grupos (Control y Probiótico) de lenguados de 136.2 ± 31.7 g bajo una carga de 21.9 Kg/m^2 . Pasado este tiempo, se realizó un estrés agudo continuado durante 15 días, consistente en perseguir a los peces durante tres minutos 3 veces por semana (L, X, V) y exponerlos al aire durante 1 minuto (M y J). En un segundo experimento, los lenguados se distribuyeron a baja densidad ($9.6 \pm 0.2 \text{ Kg/m}^2$) durante 15 días.

El crecimiento fue significativamente menor en los ejemplares mantenidos a alta densidad de cultivo (Tabla XXIX). No se detectaron diferencias significativas en la SGR (%) entre las dos dietas probióticas (tabla XXIX). La supervivencia no se afectó por la alta densidad de cultivo existente, detectándose un pequeño número de bajas a los diez días de iniciada la aplicación del estrés agudo final.

Tabla XXIX. Tasas de crecimiento de lenguado senegalés cultivado a densidad media y alta alimentado con un pienso control y adicionado de Pdp11. (Media \pm SEM). Diferentes letras significan diferencias significativas ($P < 0.05$).

Dieta	Control	Control	Pdp11	Pdp11 15 d + Control 30 d
Densidad	Media	Alta	Alta	Media 15 d + Alta 30d
Peso inicial (g)	128.0 \pm 30.2	135.8 \pm 31.6	135.6 \pm 31.8	137.2 \pm 31.9
Peso a 30 días (g)	153.2 \pm 39.0	161.5 \pm 37.8	158.8 \pm 38.3	163.4 \pm 38.7
Peso final (g)	183.5 \pm 42.3	172.1 \pm 41.8	168.1 \pm 41.6	174.0 \pm 41.9
SGR (% día ⁻¹)	0.61 \pm 0.00 ^a	0.40 \pm 0.00 ^b	0.36 \pm 0.01 ^b	0.35 \pm 0.01 ^b
Supervivencia final (%)	99.7 \pm 0.7	96.3 \pm 0.0	96.9 \pm 4.4	99.3 \pm 1.0

Entre los parámetros metabólicos, destacan los significativos mayores valores de glucógeno detectados en hígado en los ejemplares alimentados con Pdp11 y sometidos a ambos tipos de estrés. Asimismo, se observa una tendencia a menores valores de glucosa, lactato y aminoácidos libres en plasma en ejemplares control frente a los alimentados con probiótico (Tablas XXX, XXXI, XXXII). El menor nivel de cortisol registrado en los ejemplares del grupo control después del estrés agudo es indicativo de la posible existencia de una respuesta deprimida en los mismos.

Tabla XXX. Parámetros plasmáticos en *S. senegalensis* mantenidos durante dos meses en condiciones de alta densidad de cultivo, sometidos durante las dos últimas semanas a condiciones de estrés agudo a diario y alimentados con pienso control o con probiótico. Media \pm error estándar de la media (SEM). Análisis estadístico realizado mediante T-student previa comprobación de la normalidad mediante test de Shapiro-Wilk's. Diferencias entre grupos: * $p < 0.05$; ** $p < 0.005$.

Parámetro	Control	Probiótico
Cortisol (ng/mL)	11.8 \pm 1.7	15.3 \pm 1.8
Osmolalidad (mOsm/kg)	349 \pm 2	347 \pm 3
Glucosa (mM)	4.3 \pm 0.5	3.2 \pm 0.4
Lactato (mM)	0.57 \pm 0.05	0.49 \pm 0.06
Triglicéridos (mM)	11.6 \pm 1.0	10.9 \pm 2.3
Proteínas libres (mg/mL)	51.9 \pm 0.9	51.7 \pm 1.2
Aminoácidos libres (mM)	24.3 \pm 1.9	18.9 \pm 2.2

Tabla XXXI. Parámetros hepáticos en *S. senegalensis* mantenidos durante dos meses en condiciones de alta densidad de cultivo, sometidos durante las dos últimas semanas a condiciones de estrés agudo a diario y alimentados con pienso control o con probiótico. Media \pm error estándar de la media (SEM). Análisis estadístico realizado mediante T-student previa comprobación de la normalidad mediante test de Shapiro-Wilk's. Diferencias entre grupos: * $p < 0.05$; ** $p < 0.005$.

Parámetro	Control	Probiótico
Glucosa (mg glc/g pf)	3.4 \pm 0.5	3.3 \pm 0.4
Glucógeno (mg glc/g pf)	9.4 \pm 0.8	12.3 \pm 1.1 *
Triglicéridos (mg TAG/g pf)	10.1 \pm 2.2	11.8 \pm 1.8
Índice hepatosomático (%)	0.75 \pm 0.02	0.84 \pm 0.03

Tabla XXXII. Parámetros musculares en *S. senegalensis* mantenidos durante dos meses en condiciones de alta densidad de cultivo, sometidos durante las dos últimas semanas a condiciones de estrés agudo a diario y alimentados con pienso control o con probiótico. Media \pm error estándar de la media (SEM). Análisis estadístico realizado mediante T-student previa comprobación de la normalidad mediante test de Shapiro-Wilk's. Diferencias entre grupos: * $p < 0.05$; ** $p < 0.005$.

Parámetro	Control	Probiótico
Glucosa (mg glc/g pf)	0.68 \pm 0.05	0.70 \pm 0.05
Glucógeno (mg glc/g pf)	0.00 \pm 0.00	0.01 \pm 0.02 **
Triglicéridos (mg TAG/g pf)	1.5 \pm 0.2	1.5 \pm 0.1
Lactato (mg lact/g pf)	4.2 \pm 0.1	4.1 \pm 0.1
Aminoácidos (μ mol Aa/g pf)	70.0 \pm 2.4	67.1 \pm 3.0

2.5. CONCLUSIONES

CONCLUSIONES RELACIONADAS CON OBJETIVO A. Conseguir reproducción controlada en cautividad con ejemplares de lenguado procedente de cultivo.

Solamente dosis de 1.000 IU de hCG inducen una secreción significativa de esteroides sexuales en machos de lenguado. Las dosis de 500 y 1.000 IU, pero no la de 250 IU, estimulan de forma similar la producción de esperma (volumen). Todas las dosis hCG aplicadas sobre los machos tienen el efecto de estimular la puesta de huevos en las hembras de la población. Puede recomendarse una dosis hCG de 500 IU/kg para el tratamiento de los machos F1, con el fin de conseguir una estimulación adecuada de diversos parámetros reproductivos.

Todas las dosis de GnRH α de aplicación común en acuicultura inducen la secreción de esteroides sexuales y la ovulación en hembras F1. Una dosis mínima de 5 ug/kg sería suficiente para la inducción de esteroidogénesis y ovulación en hembras.

El tratamiento prolongado de reproductores F1 con implantes GnRH α de dosis baja, aplicado desde fases tempranas del desarrollo gonadal (vitelogénesis), estimula la maduración oocitaria y ovulación en hembras, pero no produce un efecto significativo sobre la producción de esperma en machos y tampoco consigue promover la fecundación de huevos.

A partir de la comparación entre reproductores mantenidos en fotoperiodo natural (control) o fotoperiodo constante, se intuye la existencia de un ritmo endógeno de reproducción en el lenguado, que persiste en ausencia de la señal lumínica de fluctuación anual del fotoperíodo y se refuerzan evidencias pasadas sobre el papel predominante de la temperatura del agua en la regulación de la puesta de huevos en cautividad de esta especie.

El uso de alimento fresco natural en reproductores F1 aumenta la secreción de esteroides sexuales durante el desarrollo gonadal, en comparación a reproductores alimentados con pienso compuesto comercial. La secreción de E2 en hembras y de 11KT en machos es mayor durante la gametogénesis en reproductores F1 alimentados de forma natural con respecto a aquellos alimentados con pienso, circunstancia que podría afectar a la cantidad y calidad de gametos.

La disfunción reproductora del lenguado senegalés de origen cautivo (F1) esta particularmente centrada en el macho, el cual presenta fallos de cortejo, independientemente del tipo de hembra con la que se estabula. Por el contrario, las hembras F1 o F2 sí son capaces de completar el cortejo con machos salvajes. La aplicación de las hormonas GnRH α y hCG y el PGF2 α aumenta la frecuencia de liberación de huevos, pero no estimula el comportamiento reproductor.

El nivel de ácido araquidónico (ARA) en la dieta afecta la composición nutricional y la fisiología reproductiva de los lenguados de cultivo (F1). Niveles de 2.3-3.2% ARA (TFA) en la dieta produjeron una composición nutricional y fisiología reproductora similares a la de lenguados salvajes. Los reproductores de lenguado son capaces de seleccionar dietas con 3% de contenido en ARA. Es posible que parte del problema reproductor del lenguado F1 esté relacionado con su nutrición en cautividad, y en particular con el contenido en ARA de estas.

Se ha desarrollado un protocolo de inducción hormonal mediante inyección, para hembras de cultivo en estado de madurez gonadal avanzado (E3), que permite la obtención de huevos para realizar la fecundación artificial. Se ha comprobado la utilidad de los implantes para inducir la maduración gonadal de hembras de cultivo.

Nuevos procedimientos sencillos de manipulación de la temperatura durante la etapa de desarrollo larvario del lenguado pueden ser aplicados para aumentar la proporción de hembras en los ejemplares cultivados y acceder a condiciones poblacionales más productivas.

CONCLUSIONES RELACIONADAS CON EL OBJETIVO B. Determinar condiciones de cultivo para una óptima respuesta inmune y resistencia a patógenos en juveniles.

El desarrollo del sistema inmune innato del lenguado se inicia durante su metamorfosis, periodo en el que genes básicos como la lisozima g y la fracción C3 del complemento experimentan una evolución muy notable.

Se ha generado una base de datos muy completa, alojada en el portal de IFAPA (<http://www.juntadeandalucia.es/agriculturaypesca/ifapa/aquagenet/soleaDB>) en la que está descrita una muy amplia lista de secuencias de genes relacionados con el sistema inmune del lenguado.

La exposición del lenguado a situaciones de estrés crónico se refleja en una disminución de la actividad de genes importantes vinculados con la inmunidad innata como el que regula la producción de la hepcidina. Los factores que en mayor medida contribuyen a esta situación son la densidad de estabulación y el empleo de dietas comerciales cuya composición se aleja de los requerimientos nutritivos y energéticos del lenguado.

Cuando se comparan ejemplares con una misma procedencia y cultivados en régimen extensivo o bajo condiciones intensivas, se demuestra una menor actividad en los segundos para genes básicos del sistema inmune innato, como lisozima, hepcidina o complemento. Este hallazgo recomienda la necesidad de mejorar las condiciones de producción, prestando especial atención a aquellos

factores que permitan mantener unos niveles adecuados de expresión de los genes que representan la primera barrera frente al ataque de patógenos.

Se han puesto a punto nuevos marcadores de estrés en el lenguado, como son los receptores de glucocorticoides y los receptores de eicosanoides, comprobándose que son una herramienta válida para conocer los procesos de aclimatación en diferentes condiciones. Los receptores de glucocorticoides podrían ser indicadores de aclimatación, ya que su pauta de expresión en los distintos tejidos permite discriminar cuándo y cómo se están activando determinados procesos fisiológicos y sus implicaciones metabólicas.

La utilización de aceite de pescado como fuente básica de lípidos en dietas con bajo contenido graso para el lenguado es fundamental de cara a obtener ejemplares cultivados en óptimas condiciones fisiológicas, capaces de responder en mejores condiciones a las situaciones de estrés.

Se sugiere el uso de sistemas de recirculación de agua para el engorde del lenguado. La estabilidad en la calidad del agua y constancia en la temperatura son dos factores muy importantes para optimizar el rendimiento de las instalaciones de engorde de lenguado.

Se identificó una cepa (S220) que presentó inhibición del crecimiento del patógeno *Vibrio harveyi* y que puede tener potencial como probiótico.

La aplicación de pulsos de 15 días del probiótico Pdp11 fresco en el preengorde y engorde de lenguado senegalés es aconsejable. Es preciso, sin embargo, optimizar la técnica de incorporación del probiótico al pienso y conocer con mayor detalle la interacción Pdp11-huésped, a nivel de la expresión de genes relacionados con la respuesta inmune y con los beneficios nutritivos registrados con anterioridad.

2.6. VALORACIÓN

Los estudios de lenguado senegalés son de alta importancia dada la susceptibilidad de esta especie, de elevado valor comercial, tiene para aclimatarse a cambios ambientales y nutricionales, propios de las condiciones de producción industrial. El haber contado con un equipo de investigadores tan diverso y comprometido con el trabajo, ha representado un enriquecimiento muy significativo de cara a la diversidad de resultados obtenidos, todos con el eje común de avanzar y consolidar el cultivo del lenguado en el país. La interacción entre los grupos de trabajo del presente proyecto ha sido muy alta, pero la gestión administrativa ha sido muy dificultosa, especialmente en el último año. Dadas las dificultades económicas que ha atravesado el proyecto algunos objetivos no han sido abordados ó lo han sido parcialmente. No obstante, y aparte del recorte presupuestario experimentado al inicio del proyecto, se aprecia un sentimiento de satisfacción y agradecimiento a JACUMAR por el apoyo recibido a lo largo de todo este tiempo.

2.7. DIFUSIÓN

Elaboración de un video de 15 minutos de duración en el que se recopila de manera divulgativa los avances conseguidos en el cultivo del lenguado en España después de diez años de investigación financiada por JACUMAR.

Los resultados del proyecto se han divulgado mediante publicaciones científicas en revistas del SCI, la presentación de comunicaciones orales en congresos de ámbito estatal (Congreso Nacional de Acuicultura) y europeo (Aquaculture Europe), seminarios específicos (5th Workshop on the Cultivation of Soles), conferencias impartidas por los científicos del equipo investigador. El detalle de los documentos divulgativos está en el correspondiente informe de difusión generado de manera simultánea al presente informe final. Se participó en las siguientes reuniones científicas y del sector para difundir los resultados:

1. XII Congreso Nacional de Acuicultura, Universidad Politécnica de Madrid, Madrid, España, 24-26 Noviembre 2009.
2. II Workshop Hispano-Brasileño de Acuicultura, CD de presentaciones, Universidad de Murcia, Murcia, España, 6-8 de Octubre, 2009
3. II Simposi d'Aquicultura de Catalunya, XV Jornades techniques de l'Expo-Rapita, Sant Carles de Rapita, Tarragona, España 15-16 d'octubre de 2009.
4. The cultivation of soles. Workshop V. CCMAR, University of the Algarve, Faro, Portugal, 5-7 April 2011 pp. 5
5. Recent Advances in the Welfare of Livestock at Slaughter. 30 June and 1st July 2011. Portsmouth. UK
6. 9th International Symposium on Reproductive Physiology of Fish. Issue, Vol. 4 No. S 8 (August 2011) ISSN: 0974- 6846 pp 96-97
7. XIII Congreso Nacional Acuicultura, Universitat Politecnica de Catalunya ESAB-Castelldefels, Barcelona, España, 21-24 de Noviembre de 2012

Por otro lado, se han generado nuevas entradas en el Genbank y se ha generación base de datos con amplia lista de secuencias de genes relacionados con el sistema inmune del lenguado, alojada en el portal (<http://www.juntadeandalucia.es/agriculturaypesca/ifapa/aquagenet/soleaDB>).

2.8. INCIDENCIAS DE DESARROLLO

La gestión administrativa y financiera en la CA de Valencia (GV) supuso un enorme retraso en la transferencia de fondos desde la Generalitat Valenciana al Centro Investigador (IATS-CSIC). La consecuencia final fue que, a la fecha de finalización del proyecto, el Centro Investigador (IATS-CSIC) todavía no había recibido los fondos previstos. El proceso de tramitación se inició en mayo 2010, con la publicación en el Diari Oficial de la Comunidad Valenciana (DOCV nº 6261/06.05.2010) de la convocatoria pública del contrato, y se cerró 2 de marzo de 2011 con la comunicación al IATS de la adjudicación de la licitación. Con ello, se inicio la redacción del contrato bilateral, que finalizó el 9 marzo 2011. En él se especificó la transferencia de fondos en dos entregas, 50% tras la firma del contrato y 50% tras finalización del proyecto, ambas contra envío del preceptivo informe científico y económico. El IATS envió a la GV la primera facturación (50% del presupuesto), que actualmente está en espera de cobro. Información mas detallada sobre este proceso puede encontrarse en el informe específico de la CA de Valencia. A pesar de no haber dispuesto de financiación, se realizaron los trabajos previstos, evitándose así afectar negativamente la ejecución de tareas coordinadas con otras CCAA. Los gastos derivados de esta investigación fueron subsanados con adelantos de otras partidas presupuestarias disponibles para el equipo investigador en el IATS y serán reemplazadas una vez se efectúe la transferencia de fondos de la GV al IATS-CSIC.

En la CA de Cantabria, no se produjo libramiento del dinero presupuestado en 2011, y las actividades se realizaron con cargo al presupuesto del propio IEO. Así, los recortes en el presupuesto de 2009 y la falta de liquidez en 2011 ocasionaron una reducción parcial de los objetivos de la actividad B.3.a y la no realización de la actividad B.3.b. (uso y aplicación de vacunas). Por otro lado, en 2011 no fue posible la realización de las infecciones experimentales propuestas en la Universidad de Cantabria por motivos internos de este organismo. Retrasos administrativos similares entre Xunta de Galicia e IEO de Vigo fueron informados desde esa CA.

En el IRTA, la mayor parte del recorte presupuestario fue aplicado al primero año y debido al funcionamiento del IRTA, se cargaron conceptos de consumo de energía por los sistemas de cultivo a la actividad del proyecto. Debido a los cambios presupuestales se centró el proyecto en objetivos A1 y A3 y un aspecto parcial de objetivo B3. No fue posible trabajar en el objetivo A2. Otras comunidades se centraron mas en los otros objetivos.

En la CA de Canarias, el presupuesto de 2011 no estuvo disponible hasta el mes de agosto, debido a cuestiones administrativas entre la Fundación Universitaria de Las Palmas (FULP) y el Instituto Canario de Ciencias Marinas (ICCM). El investigador principal optó por solicitar que el proyecto se pasara por la Universidad de Las Palmas de Gran Canaria (ULPGC), pero aún así, la disponibilidad del presupuesto no se hizo posible hasta agosto de 2011. El equipo de investigación ha intentado avanzar por todos los medios posibles para acabar las tareas previstas y el análisis de los datos con la disponibilidad económica (y

por consiguiente de personal) que ha habido sólo entre agosto y diciembre de 2011.

Los problemas administrativos registrados en las CCAA de Canarias, Cantabria, Galicia y Valencia para que los fondos llegaran en su debido tiempo a los investigadores, no se produjeron en Andalucía y Cataluña, Comunidades en las que se dispuso de buen acceso y libertad para gestionar el recurso económico por parte de los investigadores.

3.- ANEXOS CON LOS INFORMES DE LAS DISTINTAS CCAA (estos informes podrán tener el formato que determine cada CCAA, incluidos sus logotipos oficiales)

Se adjuntan seis archivos con los correspondientes informes de cada Comunidad Autónoma.