



# MASTER OFICIAL EN CULTIVOS MARINOS

Las Palmas de Gran Canaria, España

2013 - 2014

## **EFFECTOS EPIGENÉTICOS DE LA TEMPERATURA SOBRE LOS PARÁMETROS DE CRECIMIENTO, MALFORMACIÓN, MALPIGMENTACIÓN Y DIFERENCIACIÓN SEXUAL EN *SOLEA SENEGALENSIS***

BLANCA LORENZO SECO

**TESIS PRESENTADA Y PUBLICAMENTE  
DEFENDIDA PARA LA OBTENCIÓN  
DEL TÍTULO DE  
MASTER OFICIAL EN CULTIVOS MARINOS**

Las Palmas de Gran Canaria  
a 19 de Junio de 2014

EFFECTOS EPIGENÉTICOS DE LA TEMPERATURA SOBRE LOS  
PARÁMETROS DE CRECIMIENTO Y DIFERENCIACIÓN SEXUAL EN *SOLEA*  
*SENEGALENSIS*

BLANCA LORENZO SECO

Trabajo realizado en Centro de Investigación de IFAPA “El Toruño” de (El Puerto de Santa María, Cádiz), España, bajo la dirección del Dr. Manuel Manchado

Y presentando como requisito parcial para la obtención del Título de Máster Universitario Internacional en Cultivos Marinos, otorgado por la Universidad de Las Palmas de Gran Canaria (ULPGC), el Instituto Canario de Ciencias Marinas (ICCM), y el Centro Internacional de Altos Estudios Agronómicos del Mediterráneo de Zaragoza (CIHEAM).

---

El Puerto de Santa María, a 28 de Mayo, de 2014



## **AGRADECIMIENTOS**

En primer lugar quiero agradecer el gran apoyo que me ha dado mi familia durante estos meses, por encima de todo a mis padres; Ana y Manuel, los que no ha pasado un día sin escuchar un tú puedes y tenerlos a tanta distancia pero siempre sentirlos a mi lado, a mi hermana Ana, gracias de corazón; a mis amigas, Cova, Jenifer y Jesica por las largas conversaciones de desahogo al llegar a casa y entre todos recordarme que siempre estoy acompañada.

En segundo lugar agradecer al Instituto IFAPA por acoger este Trabajo de Fin de Máster. A mi Co-directora Carmen M<sup>a</sup> Hernández por su paciencia y enseñanza durante el primer año de Máster y en los preparativos de la presentación final de este trabajo, ayudándome a completar parte de mi formación académica. Igualmente a la empresa CUPIMAR S.A, por proporcionarme las instalaciones y medios necesarios para cumplir los objetivos de este experimento, entre ellos a Ricardo Zerolo quién me recordaba lo importante que era aprovechar estos conocimientos para mi futuro, además a Fernando y Pepi por ayudarme con el circuito de aguas y recogida de puestas para que todo funcionase correctamente.

En tercer lugar los compañeros del IFAPA entre ellos a Anina y Mari Ángeles por ayudarme con paciencia y dedicarme su tiempo para finalizar con éxito ciertos objetivos del experimento y al equipo de laboratorio de genética entre ellos A. Crespo y N. Martín por colaborar en la parte de expresión génica. Así mismo quiero agradecerle a M. Aparicio y Concha los buenos momentos de muestreo que me han dado junto con Javier, enseñándome el correcto trato y manejo de los animales.

Finalmente, a los aires de Andalucía por hacer mi estancia tan agradable y acogedora.



<b>1. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>3</b>
1.1 SITUACIÓN DE LA ACUICULTURA A NIVEL MUNDIAL, EUROPEO Y ESPAÑOL.....	3
1.2 EL LENGUADO, UNA ESPECIE PROMETEDORA PARA LA DIVERSIFICACIÓN.....	7
1.3 DESCRIPCIÓN GENERAL DEL LENGUADO SENEGALÉS ( <i>S. SENEGALENSIS</i> ) .....	8
1.4 LA METAMORFOSIS, UNA ETAPA CRÍTICA EN EL LENGUADO .....	11
1.5 CONTROL ENDOCRINO DE LA METAMORFOSIS Y MODULACIÓN POR FACTORES AMBIENTALES Y NUTRICIONALES .....	12
1.6 REGULACIÓN EPIGENÉTICA DE LA DIFERENCIACIÓN SEXUAL EN PECES POR TEMPERATURA .....	17
1.7 LAS MALFORMACIONES EN LENGUADO .....	21
1.8 MALPIGMENTACIONES Y/O PSEUDOALBINISMO.....	23
1.9 OBJETIVOS .....	23
<b>2. MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>27</b>
2.1 PECES E INSTALACIONES DE CULTIVO.....	27
2.2 DISEÑO EXPERIMENTAL .....	27
2.3 DETERMINACIÓN DEL CRECIMIENTO LARVARIO.....	29
2.4 DETERMINACIÓN DEL ÍNDICE METAMÓRFICO .....	30
2.5 CRECIMIENTO DESPUÉS DE LA METAMORFOSIS .....	31
2.6 CUANTIFICACIÓN DE PARÁMETROS PRODUCTIVOS.....	32
2.6.1 ESTIMACIÓN DE PARÁMETROS BIOMÉTRICOS.....	32
2.6.2 PARÁMETROS DE CALIDAD MORFOLÓGICA.....	33
2.7 ESTIMACIÓN DE LAS RATIOS DE SEXOS .....	33
2.8 PIGMENTACIÓN .....	35
2.9 EVALUACIÓN DE MALFORMACIONES .....	36
2.10 ANÁLISIS DE EXPRESIÓN GÉNICA .....	39
2.11 ESTADÍSTICA.....	41
<b>3. RESULTADOS.....</b>	<b>45</b>
3.1 EFECTO DE LOS TRATAMIENTOS DE TEMPERATURA SOBRE EL CRECIMIENTO Y METAMORFOSIS EN FASE LARVARIA .....	45
3.2 EVALUACIÓN DE CRECIMIENTO, MORFOLOGÍA, PIGMENTACIÓN Y RATIOS DE SEXO EN LAS POBLACIONES DE ALEVINES .....	46
3.3 EFECTO DE LOS TRATAMIENTOS DE TEMPERATURA SOBRE LAS MALFORMACIONES...	55
3.4 ANÁLISIS DE EXPRESIÓN GÉNICA .....	58
<b>4. DISCUSIÓN.....</b>	<b>62</b>
<b>5. CONCLUSIONES.....</b>	<b>74</b>
<b>6. REFERENCIAS .....</b>	<b>78</b>

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. PRODUCCIÓN MUNDIAL DE PESCADO OBTENIDO MEDIANTE PESCA DE CAPTURA Y ACUICULTURA (EXCLUYENDO PLANTAS ACUÁTICAS Y PRODUCTOS NO DESTINADOS AL CONSUMO HUMANO).....	4
FIGURA 2. LENGUADO SENEGALÉS, <i>S. SENEGALENSIS</i> (KAUP, 1858) DE CULTIVO. ....	9
FIGURA 3. DISTRIBUCIÓN GEOGRÁFICA DE <i>S. SENEGALENSIS</i> EN EL MEDITERRÁNEO Y ATLÁNTICO ESTE .....	11
FIGURA 4. ESTADIOS METAMÓRFICOS DE <i>S. SENEGALENSIS</i> . A- INDIVIDUO EN ESTADIO 0 CON 11 DÍAS DE EDAD. B- INDIVIDUO EN S4 CON 21 DÍAS DE EDAD.....	14
FIGURA 5. DISEÑO EXPERIMENTAL.....	28
FIGURA 6. TRATAMIENTOS TÉRMICOS APLICADOS DURANTE EL EXPERIMENTO .....	29
FIGURA 7. ESTADIOS METAMÓRFICOS DE <i>S. SENEGALENSIS</i> SEGÚN FERNÁNDEZ-DÍAZ ET AL., 2001 .....	30
FIGURA 8. REPRESENTACIÓN DE LAS MEDIDAS DE LONGITUD Y ANCHURA CORPORAL DEL PLANO SAGITAL DEL LENGUADO SENEGALÉS Y LOS SEMIEJES. ....	32
FIGURA 9. VISUALIZACIÓN DE GÓNADAS EN LUPA BINOCULAR. B- GÓNADA FEMENINA EN LA CAVIDAD ABDOMINAL DE <i>S. SENEGALENSIS</i> . C- GÓNADA FEMENINA (OVARIO) EN LA CAVIDAD ABDOMINAL DE <i>S. SENEGALENSIS</i> MALPIGMENTADO. D- GÓNADA MASCULINA (TESTÍCULO) EN LA CAVIDAD ABDOMINAL DE <i>S. SENEGALENSIS</i> . ....	34
FIGURA 10. ALEVINES <i>S. SENEGALENSIS</i> CON DIFERENTES TIPOS DE MALPIGMENTACIÓN .....	36
FIGURA 11. LENGUADO TEÑIDO CON LA TÉCNICA DE DOBLE TINCIÓN.....	37
FIGURA 12. LENGUADO ( <i>S. SENEGALENSIS</i> ) ALBINO CON ESCOLIOSIS.....	38
FIGURA 13. VISUALIZACIÓN DEL COMPLEJO DE LA ALETA CAUDAL DE <i>S. SENEGALENSIS</i> DE 44 DÍAS DE EDAD. ....	38
FIGURA 14. VISUALIZACIÓN DE LA COLUMNA VERTEBRAL DE <i>S. SENEGALENSIS</i> DE 44 DÍAS DE EDAD. ..	39
FIGURA 15. CRECIMIENTO DE LAS LARVAS DE LENGUADO SEGÚN TRATAMIENTO. ....	45
FIGURA 16. ÍNDICE METAMÓRFICO PARA LOS TRATAMIENTOS TÉRMICOS APLICADOS.....	46
FIGURA 17. PESO (A) Y LONGITUD (B) MEDIAS DURANTE EL PREENGORDE SEGÚN GRUPO EXPERIMENTAL .....	48
FIGURA 18. PESO SEGÚN SEXO Y GRUPOS EXPERIMENTALES .....	49
FIGURA 19. LONGITUD SEGÚN SEXO Y GRUPOS EXPERIMENTALES.....	49
FIGURA 20. ANCHURA SEGÚN SEXO Y GRUPOS EXPERIMENTALES .....	50
FIGURA 21. PORCENTAJE DE SEXOS SEGÚN TRATAMIENTO.....	51
FIGURA 22. PORCENTAJE DE MALPIGMENTACIONES SEGÚN EDAD Y TRATAMIENTO DURANTE LA FASE DE PREENGORDE .....	52
FIGURA 23. PESO MEDIO $\pm$ DESVIACIÓN ESTÁNDAR DE INDIVIDUOS CON MALPIGMENTACIÓN Y NORMALES DURANTE LA FASE DE PREENGORDE .....	52
FIGURA 24. PESO (A) Y LONGITUD (B) MEDIAS DE INDIVIDUOS CON MALPIGMENTACIÓN Y NORMALES SEGÚN SEXO.....	53
FIGURA 25. PROPORCIÓN DE MACHOS EN POBLACIONES MALPIGMENTADAS Y NORMALES SEGÚN TRATAMIENTO TÉRMICO. ....	53
FIGURA 26. EXCENTRICIDAD (A) Y ELIPSIDAD (B) SEGÚN GRUPO EXPERIMENTAL Y SEXO.....	55
FIGURA 27. NÚMERO DE VÉRTEBRAS TOTALES SEGÚN GRUPO EXPERIMENTAL. ....	56
FIGURA 28. NÚMERO DE VÉRTEBRAS PREHEMALES (A) Y HEMALES (B) POR INDIVIDUO SEGÚN GRUPO EXPERIMENTAL.....	56

FIGURA 29. TIPO DE MALFORMACIONES OBSERVADAS .....	57
FIGURA 30. EXPRESIÓN GÉNICA RELATIVA DE <i>TG</i> EN LOS GRUPOS S1-S2, S2-S3 Y S4.....	58
FIGURA 31. EXPRESIÓN GÉNICA RELATIVA DE <i>DNMT1</i> EN LOS GRUPOS S1-S2, S2-S3 Y S4.....	59
FIGURA 32. EXPRESIÓN GÉNICA DE <i>CYP19A1</i> (A) Y <i>ERA</i> (B) EN LOS TRATAMIENTOS S1-S2, S2-S3 Y S4. .....	59

## LISTA DE TABLAS

TABLA I. PRODUCCIÓN MUNDIAL DE PESCADO PARA CONSUMO HUMANO DE ACUICULTURA CONTINENTAL Y MARINA 1990-2012 (FAO 2014A).....	5
TABLA II. PRODUCCIÓN ACUÍCOLA MUNDIAL DE PECES, CRUSTÁCEOS, MOLUSCOS Y OTRAS ESPECIES ACUÁTICAS, EN EL AÑO 2012 TANTO EN ACUICULTURA MARINA COMO CONTINENTAL (FAO 2014A).....	5
TABLA III. PRINCIPALES PAÍSES PRODUCTORES DE PRODUCTOS ACUÍCOLAS EN EUROPA PARA EL AÑO 2012 (FAO 2014). .....	6
TABLA IV. NÚMERO DE ANIMALES MUESTREADO PARA CADA EDAD Y TRATAMIENTO .....	32
TABLA V. GENES A ESTUDIAR MEDIANTE QPCR EN ESTE ESTUDIO. SE INDICA EL NOMBRE DEL GEN, EL TAMAÑO DE AMPLICÓN Y LOS CEBADORES USADOS.....	41
TABLA VI. SGR POR PERIODOS PARA CADA TRATAMIENTO DE TEMPERATURA.....	48
TABLA VII. ANÁLISIS ESTADÍSTICO (ANOVA) PARA EL PESO. LA PIGMENTACIÓN, SEXO, TRATAMIENTO DE TEMPERATURA SE CONSIDERARON EFECTOS FIJOS Y LA EDAD COVARIABLE .....	54
TABLA VIII. INCIDENCIA DE MALFORMACIONES SEGÚN TRATAMIENTO.....	57

## **LISTA DE ACRÓNIMOS**

CRH: Hormona adrenocorticotropa

Cyp19a1: Aromatasa gonadal

Dnmt1: ADN (citosina-5)-metiltransferasa 1

DPE: Días después de eclosión

Era: Receptor de estrógenos alfa

FAO: Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura

H-H-T: Eje hipotálamo hipófisis tiroideo

MTm: Millones de toneladas métricas

N: Tamaño real de la muestra

RAE: Real Academia Española

SGR: Tasa de crecimiento diario

Tg: Tiroglobulina

THs: Hormonas tiroideas

THR: receptor específico de hormonas tiroideas

Tm: Tonelada métrica

TSH: Hormona hipofisaria estimulante del tiroides

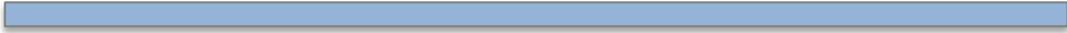
TSP: Periodo de termosensibilidad

## RESUMEN

En el presente trabajo se ha evaluado la influencia de varios regímenes de temperatura sobre los parámetros productivos de crecimiento y morfológicos, diferenciación sexual y expresión génica en larvas de lenguado. Para ello, las larvas se expusieron a 16,5°C desde el día 8 tras la eclosión hasta alcanzar un estadio metamórfico S1-S2, S2-S3 o S4. Sólo las larvas del grupo S4 retrasaron su crecimiento y la metamorfosis durante fase larvaria respecto a los otros dos grupos experimentales. Sin embargo, durante el preengorde se observó un crecimiento compensatorio del grupo S4 sin encontrar diferencias significativas al final del período de evaluación (176 días tras a eclosión). Al evaluar las ratios de sexos, se pudo observar que los tres grupos experimentales tenían más hembras que los cultivos control a 20°C (58 y 43% de los grupos S1-S2 y S2-S3, respectivamente). Además, las hembras siempre presentaron mayor crecimiento que los machos. Curiosamente, los lenguados malpigmentados tuvieron una mayor tasa de machos que explicaría su menor crecimiento respecto a las poblaciones normales. El incremento de expresión de *tg* en animales cultivados a 16,5°C indica una modulación del eje tiroideo para influir metabolismo y metamorfosis. La mayor expresión de la metilasa *dnmt1* a 16,5°C en premetamorfosis indica un cambio en su actividad y posiblemente de los patrones de metilación. El incremento de expresión de *era* y de *cyp19a1* a 16,5°C en esta misma fase sugiere que una regulación de los niveles de estrógenos podría contribuir a aumentar las hembras en la población. En conclusión, la aplicación de tratamientos de agua fría cortos (grupo S1-S2) sería suficiente para obtener resultados óptimos en producción de hembras, con menor gasto económico y minimizando sus efectos sobre el crecimiento.



# INTRODUCCIÓN



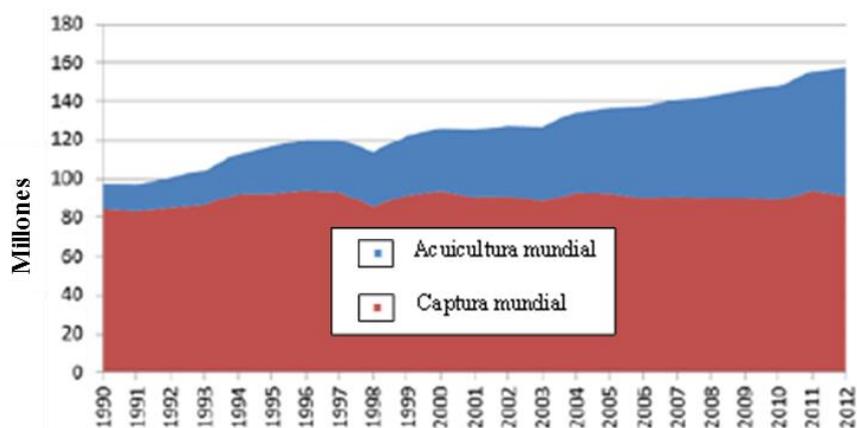


## **1. INTRODUCCIÓN**

La acuicultura es una actividad que abarca prácticas muy variadas y una amplia gama de especies, sistemas y técnicas de producción. Puede definirse como la técnica de cultivo de especies acuáticas vegetales y animales (RAE, 2014). La acuicultura tiene una historia de 4.000 años, pero ha sido en los últimos 50 cuando se ha convertido en una actividad socioeconómica relevante, dando empleo a más de 12 millones de personas en el mundo. No se trata únicamente de un complemento de la actividad pesquera, sino que es la ganadería con mayor proyección de futuro. Tiene a su favor que el 70% de la superficie del planeta es agua, los animales acuáticos son más eficientes en la conversión de su alimento que los vertebrados terrestres y sus tasas de reproducción son varios órdenes de magnitud superiores a las de éstos. Además, existen otras finalidades para esta actividad, como la producción de biocombustibles, la elaboración de productos farmacéuticos, la suelta de ejemplares para la pesca deportiva, la repoblación del medio natural, para la acuariofilia o el apoyo a la investigación científica (APROMAR y ESACUA, 2013).

### **1.1 Situación de la acuicultura a nivel mundial, europeo y español**

La pesca de captura y la acuicultura suministraron al mundo más de 153 millones de toneladas de pescado (MTm) en 2012 (Fig. 1). La contribución de la acuicultura fue de 90,43 MTm, un 42,2% frente al 25,7% del año 2000. Del total, unas 66,6 MTm fueron pescado para consumo humano mientras que 23,78 MTm fueron algas acuáticas (principalmente algas marinas) y 22.400 Tm fueron productos no alimenticios como perlas, conchas, etc. (FAO, 2014).



**Figura 1. Producción mundial de pescado obtenido mediante pesca de captura y acuicultura (excluyendo plantas acuáticas y productos no destinados al consumo humano). Las unidades se presentan como MTm de peso vivo. FAO 2014.**

La evolución de la producción acuícola mundial de pescado para consumo humano desde 1990 hasta el año 2012 se puede observar en la Tabla I (FAO, 2014). Asia es el principal productor muy lejano del siguiente que es América. Europa tendría una producción total de 2,8 MTm en 2012, principalmente de especies marinas. En cuanto a los mejores productores acuícolas mundialmente de pescado para consumo humano, encontramos en primer lugar a China, con 41,1 MTm y casi un 61,7% del total producido. Entre los 15 primeros países, sólo se encontraría un país europeo, Noruega, con 1,3 MTm (FAO, 2014). Por grupo de especies, los peces fueron el grupo más importante alcanzando las 44,1 MTm y el 66,3% de la producción total (Tabla II) siendo los peces herbívoros y omnívoros lo más importantes en términos de volumen. Se calcula que más de 600 especies acuáticas son cultivadas en todo el mundo, aunque la mayor parte de producción acuícola depende de unas cuantas decenas de especies, siendo geográficamente la tilapia, la especie de acuicultura más expandida por el mundo (FAO, 2014).

**Tabla I. Producción mundial de pescado para consumo humano de acuicultura continental y marina 1990-2012 (FAO 2014).**

		1990	1995	2000	2005	2010	2012
<b>África</b>	Acuicultura continental	77,279	102,703	391,581	632,001	1,273,503	1,467,749
	Acuicultura marina	3,736	7,589	8,107	14,181	13,088	17,618
	<b>África total</b>	<b>81,015</b>	<b>110292</b>	<b>399,688</b>	<b>646,182</b>	<b>1,286,591</b>	<b>1,485,367</b>
<b>América</b>	Acuicultura continental	300,536	398,112	609,909	748,545	977,923	1,177,439
	Acuicultura marina	247,943	521,459	813,524	1,428,195	1,603,166	2,009,881
	<b>América total</b>	<b>548,479</b>	<b>919,571</b>	<b>1,423,433</b>	<b>2,176,740</b>	<b>2,581,089</b>	<b>3,187,319</b>
<b>Asia</b>	Acuicultura continental	6,574,192	12,650,165	17,321,975	24,278,467	34,065,242	38,835,173
	Acuicultura marina	4,227,464	9,027,349	11,100,514	14,909,386	18,374,898	20,064,895
	<b>Asia total</b>	<b>10,801,656</b>	<b>21,677,514</b>	<b>28,422,489</b>	<b>39,187,853</b>	<b>52,440,140</b>	<b>58,900,068</b>
<b>Europa</b>	Acuicultura continental	711,245	445,512	454,849	460,048	466,615	461,095
	Acuicultura marina	890,279	1,135,395	1,595,840	1,674,856	2,077,363	2,415,213
	<b>Europa total</b>	<b>1,601,524</b>	<b>1,580,907</b>	<b>2,050,689</b>	<b>2,134,904</b>	<b>2,543,978</b>	<b>2,876,309</b>
<b>Oceanía</b>	Acuicultura continental	1,781	2,692	3,808	1,800	3,660	4,309
	Acuicultura marina	40,224	91,546	117,674	149,666	181,957	179,882
	<b>Oceanía total</b>	<b>42,005</b>	<b>94,238</b>	<b>121,482</b>	<b>151,466</b>	<b>185,617</b>	<b>184,191</b>
<b>Mundial</b>		<b>13,074,679</b>	<b>24,382,522</b>	<b>32,417,781</b>	<b>44,297,145</b>	<b>59,037,416</b>	<b>66,633,253</b>

**Tabla II. Producción acuícola mundial de peces, crustáceos, moluscos y otras especies acuáticas, en el año 2012 tanto en acuicultura marina como continental (FAO 2014).**

	Acuicultura continental	Acuicultura marina	SUB-TOTAL	
	(miles de Tm)	(miles de Tm)	(miles de Tm)	(%)
<b>Peces</b>	38.599	5.552	44.151	66,3
<b>Crustáceos</b>	2.530	3.917	6.447	9,7
<b>Moluscos</b>	287	14.884	15.171	22,8
<b>Otras especies</b>	530	335	865	1,3
<b>TOTAL</b>	<b>41,946</b>	<b>24,687</b>	<b>66,633</b>	<b>100</b>

En Europa, en el año 2012, se produjeron un total de 2,8 MTm en acuicultura destinado a consumo humano. Noruega, produjo un total de 1,3 MTm, un 45,9% del total de producción acuícola en Europa mientras que España ocupó el segundo lugar con una producción de 264.160 toneladas, un 9,2% de la producción total. Francia produjo 204,860 toneladas, un 7,1 % del total producido (Tabla III) (FAO 2014). La

acuicultura producida en la Unión Europea consta básicamente de peces y moluscos siendo mucho menor la cantidad de producción de crustáceos, algas u otros invertebrados. La principal especie producida en la UE es el mejillón (355,555 Tm), seguido de la trucha arco iris (176,983 Tm) y salmón atlántico (171,983 Tm). Si se considera el valor de primera venta, el salmón atlántico es la primera especie de crianza (840 millones €), seguida por la trucha arco iris (565 millones €) y la dorada (485 €), (APROMAR y ESACUA, 2013).

**Tabla III. Principales países productores de productos acuícolas en Europa para el año 2012 (FAO 2014).**

<b>EUROPA</b>	<b>Tm</b>	<b>Porcentaje</b>
Noruega	1.321.119	45,9%
España	264.160	9,2%
Francia	204.860	7,1%
Ucrania	203.036	7,1%
Italia	162.618	5,7%
Rusia	144.871	5,0%
Grecia	137.594	4,8%
Islas Feroe	76.564	2,7%
Países Bajos	46.149	1,6%
Irlanda	36.094	1,3%
Dinamarca	33.586	1,2%
Polonia	32.261	1,1%
Alemania	26.280	0,9%
República Checa	20.763	0,7%
Resto de Europa	166.354	5,8%
<b>Total</b>	<b>2.876.309</b>	<b>100,0%</b>

España es el Estado miembro de la UE con un mayor volumen de producción en acuicultura (21,5% del total de la UE), seguido por Francia (17,8%) y el Reino Unido (14,0%). Sin embargo, cuando se considera el valor de la producción, el Reino Unido es el principal Estado miembro productor (20,5% del valor total), seguido por Francia (19,2%) y Grecia (15%). España ocupa la cuarta posición con 457,3 millones (11,9%). No obstante, hay que indicar que la producción acuícola europea está en retroceso en torno a un 0,9% anual, mientras que el total mundial se ha mantenido con ritmos positivos de 6,4% anual (APROMAR y ESACUA, 2013).

En España, la producción acuícola alcanzó las 271,963 Tm, con un valor en su primera venta de 457,3 M€. El recurso acuático vivo más abundante producido es el mejillón (*Mytilus galloprovincialis*) con una producción acuícola de 212.556 Tm en el año 2011. En cuanto a la piscicultura, las tres primeras especies producidas en dicho año fueron la dorada, trucha arco iris y lubina. La dorada se produjo casi en un 50% en la comunidad valenciana, la lubina principalmente en Andalucía (28%) y la trucha arco iris en Castilla-León (30,6%). Sin embargo, en España hay producción secundaria de nuevas especies tales como corvina, lenguado, seriola o atún rojo (APROMAR y ESACUA, 2013).

## **1.2 El lenguado, una especie prometedora para la diversificación**

Los países pioneros en el cultivo de peces planos en Europa fueron Gran Bretaña con el cultivo del lenguado común (*Solea solea*, Linneo 1758) y el fletán (*Hipoglossus hipoglossus*). Más tarde países como Portugal, España, Grecia, Alemania y Noruega, se unieron también a emprender nuevos cultivos tales como rodaballo y lenguado. Es en los últimos 30 años cuando los lenguados, tanto las especies *S. solea* como *Solea senegalensis*, Kaup 1858, aparecen en el sur de Europa como un buen candidato para abastecer los mercados europeos, saturados de dorada y lubina (Howell, 1997).

El lenguado senegalés (*S. senegalensis*) es una de las especies más prometedoras en la acuicultura española por su alto valor comercial y mercado potencial. Aunque la acuicultura del lenguado comenzó en la década de los 80 en Andalucía y Algarve, no fue hasta finales de los 90 cuando se hicieron los primeros intentos de producción industrial. En este momento, numerosos problemas tecnológicos en el cultivo larvario limitaron el despegue de este sector.

Posteriormente, superados algunos de estos cuellos de botella, hubo una segunda etapa de auge entre los años 2000-2005, y se llegaron a alcanzar un máximo de 55 Tm, fundamentalmente mediante engorde en estero (APROMAR, 2009; APROMAR y ESACUA, 2013). En este caso, la industria estuvo limitada por los importantes brotes de enfermedades bacterianas que ocurrían en los sistemas extensivos de producción, principal sistema de engorde (Cañavate, 2005). Recientemente, la implementación de nuevas tecnologías de recirculación abre una nueva etapa en la acuicultura de lenguado por el control que se ejerce sobre el sistema de producción tanto a nivel físico-químico como microbiológico. Así, en el año 2012 se han alcanzado las 194 Tm, con un incremento de producción del 76,4% (APROMAR y ESACUA, 2013). A pesar de los notables avances conseguidos durante la última década sobre el conocimiento de su biología y algunos aspectos sobre cultivo, aún existen diversos aspectos que necesitan optimizarse todavía, especialmente de cara a su explotación industrial, incluyendo aspectos genéticos y de regulación epigenética.

### **1.3 Descripción general del lenguado senegalés (*S. senegalensis*)**

La taxonomía de *S. senegalensis* (Kaup, 1858) según Bauchot y Pras, 1980 sería:

Reino: Animalia

Subreino: Metazoa

Phylum: Chordata

Subphylum: Vertebrata (Craniata)

Subtipo: Gnathosmata

Superclase: Pisces

Clase: Osteichthyes (Actinopterygii)

Orden: Heterosomata (Pleuronectiformes)

Suborden: Pleuronectoidei

Infraorden: Soleoidei

Familia: Soleidae

Subfamilia Soleinae

Género: Solea

Especie: *Solea senegalensis*



**Figura 2. Lenguado senegalés, *S. senegalensis* (Kaup, 1858) de cultivo.**  
Fotografía realizada por B. Lorenzo, 2014.

*S. senegalensis* (Kaup, 1858) es un teleósteo, pez plano con cuerpo ovalado y alargado, asociado a un hábito de vida bentónico, y es considerado monofilético (Fig. 2). Los Soleidos se caracterizan por tener un hocico redondo y carnoso, boca pequeña y arqueada que se abre hacia abajo, sin dientes palatinos; tienen principalmente desarrollada la mandíbula superior que la inferior (Quéro *et al.*, 1986; Ben-Tuvia, 1990). Las aletas dorsal y caudal se encuentran unidas por una membrana al pedúnculo caudal. La línea lateral describe una curva suave en su cabeza (ICTIOTERM, 2013). Su coloración, en la cara ocular es muy variable, generalmente marrón verdoso, con numerosas manchas azuladas distribuidas en la base de las aletas dorsal y anal además de pequeñas repartidas por la superficie dorsal, la aleta pectoral con la membrana interradyal negra y los radios amarillos; su cara ciega es de color blanco. En cuanto a la talla, pueden llegar a alcanzar los 50 cm de longitud (ICTIOTERM, 2013). El número de vértebras oscila entre 44 y 46 (Ben-Tuvia, 1990; Gavaia *et al.*, 2002). Es un pez gonocórico con sexos separados, sin caracteres sexuales externos diferenciales y que madura por primera vez al tercer año de vida con unos 25-30 cm de longitud (Imsland *et al.*, 2003). En el medio natural es capaz

de reproducirse durante prácticamente todo el año (Arias y Drake, 1990). Los huevos miden entre 0,9 y 1,5 mm, son pelágicos y la temperatura del agua del mar en la época de puesta suele ser superior a los 16°C (Dinis *et al.*, 1999). Tras el desove, los huevos dan lugar a larvas pelágicas que poseen simetría bilateral. Después de 10- 12 días de vida en el subsistema planctónico, experimentan una metamorfosis, de una semana de duración aproximadamente para transformarse en juveniles asimétricos de vida bentónica en la cual los ojos se situarán en el lado derecho del cuerpo una vez haya finalizado dicha etapa de metamorfosis (Fernández-Díaz *et al.*, 2001). A partir de ese momento, comienza a desarrollar su vida en sustratos arenosos y fangosos, extendiéndose desde el entorno intermareal hasta profundidades en torno a 100 metros en el mar siendo su hábitat más frecuente entre los 12 y 65 m de profundidad (Quéro *et al.*, 1986). Durante el resto de su ciclo de vida, la alimentación se realiza a base de crustáceos, bivalvos y poliquetos, capturados en el subsistema bentónico.

La distribución geográfica de *S. senegalensis* (Fig. 3) se limita a la costa Oeste Africana y a la costa europea del Atlántico y Mediterráneo Occidental. En el Atlántico se extiende desde Senegal hasta la región de Perthuis Charanteis en Francia y en el Mediterráneo, se ha descrito en el sur de España hasta el Golfo de León y en el norte de Túnez (Bauchot y Pras, 1980; Quéro *et al.*, 1986; Ben-Tuvia, 1990; FISHBASE).



**Figura 3.** Distribución geográfica de *S. senegalensis* en el Mediterráneo y Atlántico Este.

#### **1.4 La metamorfosis, una etapa crítica en el lenguado**

Todos los peces planos comparten en común un desarrollo larvario durante el cual larvas de simetría bilateral sufren importantes y drásticos cambios morfológicos y fisiológicos para convertirse en juveniles asimétricos adaptados al fondo marino (Miwa *et al.*, 1988; Manchado *et al.*, 2008a). Cada especie de pez plano se caracteriza por llevar a cabo la metamorfosis en diferentes momentos de su desarrollo. Así, el lenguado senegalés comienza la migración del ojo hacia el día 11 después de la eclosión y finaliza hacia el día 19-20 (Fernández-Díaz *et al.*, 2001). El rodaballo (*Scophthalmus maximus*, familia *Scophthalmidae*) realiza la metamorfosis entre el día 19 al 32 después de la eclosión, mientras que el lenguado japonés (*Paralichthys olivaceus*, familia *Paralichthyidae*) entre los días 35-46 tras la eclosión (Marchand *et al.*, 2004). Otros peces planos como el fletán del atlántico (*Hippoglossus hippoglossus*, familia *Pleuronectidae*) llevan a cabo la metamorfosis aún a etapas más tardías, entre 80-100 días después de la eclosión (Einarsdottir *et al.*, 2006). A pesar de estas diferencias, en la temporalidad y duración de la metamorfosis este proceso está mediado por hormonas tiroideas (THs) en estas especies (Miwa *et al.*, 1988; Solbakken *et al.*, 1999; Manchado *et al.*, 2008a).

La metamorfosis en *S. senegalensis*, supone una importante transformación anatómica que implica la rotación de 90°C en la posición de su cuerpo y la migración de uno de sus ojos al lado superior ocular, flexión del urostilo y reorganización de los órganos internos (Gavaia *et al.*, 2002). Tal transformación se asocia con el asentamiento de las larvas al sustrato y con el cambio de hábitat pelágico a bentónico y por lo tanto implica cambios en los hábitos alimenticios y digestivos. Los estadios larvarios de metamorfosis en lenguado se clasifican según Fernández-Díaz *et al.*, 2001, en 5 estadios: **Estadio 0**, antes del inicio de metamorfosis, cuando la larva es simétrica con un plano de natación vertical; **Estadio 1**, metamorfosis temprana, el ojo izquierdo empieza a migrar hacia la posición dorsal, hasta que toca la línea media de la superficie dorsal, en este estadio los individuos no son completamente simétricos; **Estadio 2**, cuando el ojo empieza a rebasar el borde y puede ser visto desde el lado derecho ocular, continuando la migración hasta llegar a la línea media de la superficie dorsal; **Estadio 3**, cuando los individuos cambian su plano de natación y el ojo rebasa el borde continúa migrando hacia el lado izquierdo. Finalmente, el **Estadio 4** o metamorfosis tardía, se considera cuando el desplazamiento del ojo se completa y el arco orbital es claramente visible (Fig. 4 y 8).

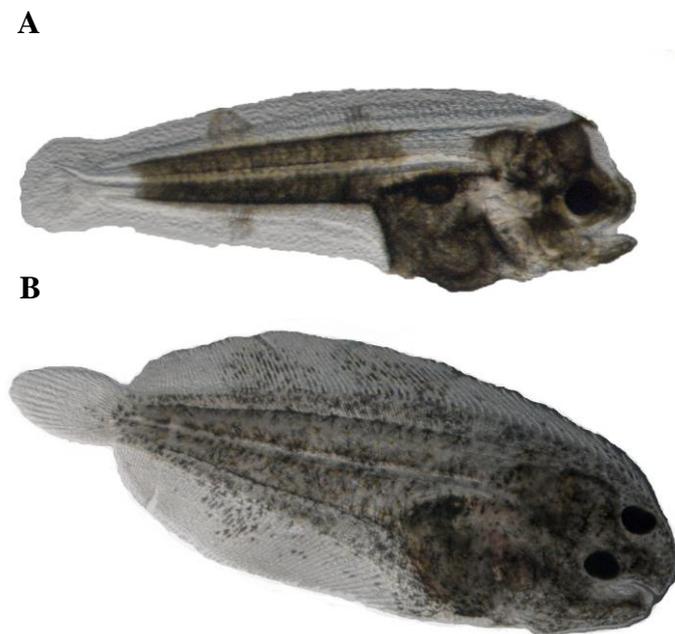
### **1.5 Control endocrino de la metamorfosis y modulación por factores ambientales y nutricionales**

Las THs, tiroxina (T4) y triyodotironina (T3) juegan un papel fundamental en el desarrollo de vertebrados como reguladoras en el metabolismo, crecimiento y diferenciación sexual. Éstas estimulan la metamorfosis de anfibios mientras reprimen la de lampreas (Shi *et al.*, 1996; Youson, 1997). En teleósteos, las THs se han asociado a todos aquellos cambios morfológicos y ecológicos que ocurren durante la

transformación de larvas a juveniles. En peces planos, la metamorfosis se ha asociado a un incremento en los niveles de T4 alcanzando un máximo hacia el clímax de la metamorfosis y reduciéndose progresivamente (Miwa *et al.*, 1988; Solbakken *et al.*, 1999; Manchado *et al.*, 2008a). De esta forma, las THs regulan todos aquellos cambios morfológicos que implican la translocación de un ojo a la cara opuesta y un desarrollo asimétrico del cráneo y mandíbula así como todos los cambios fisiológicos entre los que se incluyen el cambio de poblaciones eritrocíticas (Miwa y Inui, 1991) y de las cadenas ligeras de miosina (Yamano *et al.*, 1994b), de las formas embrionarias a las de adulto. Asimismo, aparecen las células ricas en mitocondrias en branquias típicas de juveniles que intervienen en la osmorregulación (Schreiber y Specker, 2000), se diferencian las glándulas gástricas (Miwa *et al.*, 1991) y una reorganización de la retina (Evans y Fernald, 1993; Evans *et al.*, 1993).

Las hormonas tiroideas se sintetizan y almacenan como tiroglobulina (*tg*), proteína que constituye la mayor parte del coloide folicular del tiroides. Para la síntesis, almacenamiento, liberación e interconversión de hormonas tiroideas son necesarios varios pasos que incluyen la captación del ión yoduro por los folículos tiroideos, su oxidación y la yodación de grupos tirosina (llevada a cabo por la peroxidasa tiroidea (TPO), el acoplamiento de residuos de yodotirosina mediante enlace éter para generar las yodotironinas, su proteólisis por las catepsinas y finalmente su liberación al torrente sanguíneo. La síntesis de hormonas tiroideas está regulada por el eje H-H-T. El factor CRH en peces induce la secreción de la hormona hipofisiaria estimulante del tiroides (TSH), al unirse específicamente a los receptores de la membrana hipofisiaria, activar el sistema adenilciclase y producir una exocitosis de los gránulos que contienen TSH. A su vez, la TSH, compuesta por dos subunidades alfa y beta, activa el sistema adenilciclase, al unirse a sus receptores en

la glándula tiroides regulando la síntesis y liberación de las hormonas tiroideas. Cuando las THs alcanzan su tejido diana migran hacia el núcleo y se unen a su receptor específico (THR). En mamíferos se han descrito dos tipos principales de THR, denominados TR $\alpha$  y TR $\beta$ . En peces, los receptores tipo TR $\alpha$  están codificados por dos genes parálogos, denominados TR $\alpha$ a y TR $\alpha$ b, con diferentes patrones de expresión (Yamano *et al.*, 1994a; Yamano y Miwa, 1998).



**Figura 4. Estadios metamórficos de *S. senegalensis*: A- Individuo en estadio 0 con 11 días de edad. B- Individuo en S4 con 21 días de edad.** Fotografías realizadas a 1 aumento por B. Lorenzo, 2013.

La regulación de la síntesis de THs es compleja. La producción de T3 y de su prohormona tiroxina (T4) se activa por la TSH, hormona glicoproteica secretada por el lóbulo anterior de la hipófisis. A su vez, esta enzima está regulada en mamíferos por un factor regulador hipotalámico, llamado hormona liberadora de la tirotrópina (TRH), aunque en peces la CRH juega un papel más importante (De Groef *et al.*, 2006). La regulación de THs estaría regulada por una retroalimentación negativa tanto a niveles hipofisarios como hipotalámicos. Así, concentraciones elevadas de T3 y T4 en plasma sanguíneo inhibirían la producción de TSH en la hipófisis y de los

factores hipotalámicos (Manchado *et al.*, 2008a). Para mantener un control estricto en síntesis y liberación de THs, ambas T3 y T4 ejercen una retroalimentación negativa sobre la TSH $\beta$  (Dumont *et al.*, 2005). Además, las THs ejercerían también una retroalimentación negativa sobre su precursor, la tg. Por ello, este gen tg se ha sugerido como un marcador útil para monitorizar la actividad tiroidea durante el desarrollo larvario (Manchado *et al.*, 2008a). Además, indirectamente las THs van a regular otras cascadas metabólicas y de señalización a través de la modulación de la transcripción de la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (Manchado *et al.*, 2007), citoqueratinas tipo I (Infante *et al.*, 2007) o las chaperoninas (Manchado *et al.*, 2008b). De igual forma, regulan positivamente la isoforma 4 factor de elongación 1 alfa (Infante *et al.*, 2008a) o las calsecuestrinas musculares (Infante *et al.*, 2011). El estudio de los componentes del eje H-H-T es esencial para evaluar su posible impacto sobre la metamorfosis de los efectos ambientales y nutricionales.

Aunque la metamorfosis es un proceso regulado hormonalmente, éste va a estar modulado por numerosos factores ambientales tales como la temperatura y la nutrición. En cuanto a la alimentación, se ha demostrado que larvas alimentadas con dieta inerte a partir del día 5 tras la eclosión retrasa el desarrollo de la metamorfosis, con menor tasa de crecimiento y supervivencia y una migración del ojo 5-6 días posteriores a las larvas alimentadas con presas vivas (Fernández-Díaz *et al.*, 2001). De hecho, las larvas durante la etapa premetamórfica van a requerir un importante aporte energético principalmente de lípidos y proteínas para mantener unas altas tasas de crecimiento y acumular las reservas para poder desarrollar con éxito la metamorfosis. Por ello, un adecuado balanceo de la cantidad de triglicéridos y fosfolípidos en estas primeras fases es esencial para el éxito de la metamorfosis. De hecho, durante la metamorfosis las larvas reducen su tasa de ingesta y movilizan

fundamentalmente la energía acumulada en las primeras fases para llevar a cabo la metamorfosis (Yufera *et al.*, 1999, Parra y Yufera, 2001). Por lo que la alimentación larvaria también va a jugar un papel clave en el éxito de la metamorfosis, y sobre la cual existe extensa literatura que no se revisará en este trabajo al no ser objeto directo del mismo.

En peces teleósteos, como es el caso de *S. senegalensis*, las condiciones térmicas al inicio del desarrollo son críticas, ya que van a influir en gran parte en la expresión del fenotipo final (Johnston, 2006). La temperatura es uno de los factores más influyente en la miogénesis de muchas especies de peces de producción acuícola como la lubina (*D. labrax*, Linnaeus) (Alami-Durante *et al.*, 2007), o el salmón del Atlántico (*Salmo salar*) (Macqueen *et al.*, 2008), etc. Se ha observado que embriones de lenguado senegalés incubados a diferentes temperaturas (21°C, 18°C y 15°C), muestran diferencias en el crecimiento en etapas de desarrollo larvario, además de influenciar su fenotipo y perfiles de expresión génica (Campos *et al.*, 2013a). Los embriones de *S. senegalensis* incubados a 21°C tuvieron un desarrollo embrionario más rápido que los incubados a 18°C y 15°C. Igualmente, tras la eclosión, el desarrollo fue más rápido y el diámetro de fibra muscular fue mayor en larvas incubadas a temperatura de 21°C que a 15°C. Además, la aplicación de termociclos día-noche con tres grados de diferencia en el rango 19-22°C, va a modificar las ratio de sexos y niveles de esteroides sexuales (Blanco-Vives *et al.*, 2011). Estudios previos del grupo del Dr. Manchado también han demostrado que tratamientos térmicos con agua fría (16°C) producían una mayor tasa de hembras cuando se aplicaban durante el período de metamorfosis obteniendo un porcentaje de hembras del 54% en agua a 16°C y del 38% a 20°C. Aunque los animales cultivados a 16°C retrasaban mucho el crecimiento, estos acababan perfectamente la metamorfosis, lo

que indica que son capaces de redistribuir la energía para la finalización de metamorfosis.

## **1.6 Regulación epigenética de la diferenciación sexual en peces por temperatura**

En cuanto al término epigenética es importante mencionar el interés específico en este trabajo con relación a las modificaciones en la expresión de los genes que no obedecen a una alteración en la secuenciación del ADN ni son heredables. La temperatura se ha identificado como uno de los principales factores de regulación epigenética en peces. La temperatura es capaz de modular el desarrollo muscular lo que se conoce como “impronta térmica”. Esto significa que la temperatura que ocurre durante la fase embrionaria es capaz de tener un efecto duradero sobre la estructura muscular y el tamaño corporal. La existencia de este fenómeno es común en peces y la programación dependiente de temperatura se ha identificado en salmón, fletán bacalao, lubina o pez cebra (Galloway *et al.*, 1999; Johnston *et al.*, 2000; Alami-Durante *et al.*, 2007; Macqueen *et al.*, 2008; Steinbacher *et al.*, 2011). Dicha interacción entre temperatura y diferenciación de músculo es compleja y está muy influenciada por la especie, duración de la impronta o el intervalo de desarrollo evaluado (revisado en Steinbacher *et al.*, 2011). Recientes estudios en lenguado sugieren que la temperatura durante la incubación de embriones puede determinar un efecto duradero en la composición y desarrollo muscular. A temperaturas frías (15°C) parece que el desarrollo muscular del lenguado es menor, modificando ligeramente la expresión de algunos genes implicados en el desarrollo muscular y estrés en fases tempranas (Campos *et al.*, 2013a). Lo que queda claro es que la temperatura fría en lenguado activa la expresión las metiltransferasas dependiente de citosina *dnmt1* y *dnmt3b* e incrementa la metilación del promotor del gen *myod* reduciendo su expresión (Campos *et al.*, 2013c). Sin embargo, estos

estudios sólo han evaluado los efectos a corto plazo (no más de 30 días) con pequeñas diferencias entre tratamientos. Por tanto, se requiere de estudios más completos sobre el efecto de la temperatura durante el desarrollo embrionario ligado a la fase de desarrollo y durante períodos más largos para establecer de forma más precisa la naturaleza de los cambios observados y poder implementar protocolos de impronta para el beneficio de las empresas.

La temperatura se ha convertido en otro factor clave capaz de regular los ratios de sexos en las poblaciones de peces mediante modulación epigenética. Esto es muy importante para aquellas especies con un crecimiento diferencial entre sexos. En el caso del orden salmoniformes y de algunas especies tropicales de la familia de los cíclidos, los machos presentan un crecimiento mayor que las hembras. Sin embargo, en el lenguado como en otras muchas especies de gadiformes, anguiliformes y pleuronectiformes, las hembras son mayores que los machos. En peces planos, el mayor crecimiento de las hembras frente los machos ha sido observado en las familias Soleidae, Psettodidae, Pleuronectidae, Bothidae y Scopthalmidae (De Veen, 1976; Druzhinin y Petrova, 1980; Deniel, 1990; Imsland *et al.*, 1997). Esta información tiene un interés particular en la acuicultura ya que se pueden establecer estrategias para conseguir poblaciones monosexo o con un mayor porcentaje de un sexo determinado reduciendo los tiempos de engorde y la dispersión por tallas (Piferrer, 2001). Un estudio previo ha observado que las hembras de *S. senegalensis* presentan un crecimiento mayor que los machos, especialmente a densidades altas por factores fisiológicos y/o el establecimiento de jerarquías de dominancia (Sánchez *et al.*, 2010). Aunque hay varias estrategias de feminización (directa o indirecta; Piferrer, 2001), el manejo de temperatura para regular la proporción de sexos ligado al control del crecimiento es un factor clave que puede incorporarse a los protocolos

de producción y que está regulado a nivel epigenético (Piferrer, 2013) abriendo nuevas ventanas a la innovación en los procedimientos de producción. Para ello, es necesario conocer los mecanismos subyacentes y definir las ventanas adecuadas de aplicación para aplicarlo de forma eficiente en la industria. Por ejemplo, en lubina se ha determinado que la temperatura contribuye de forma similar a la genética a la determinación sexual y el período de termosensibilidad (TSP) se ha ubicado en el período larvario, antes del desarrollo de las gónadas. Temperaturas altas durante el TSP provocan una mayor metilación del promotor de *cyp19a1* que promueve un sesgo hacia la proporción de machos en la población (Revisado en Piferrer, 2013). Estudios del grupo del Dr. Manchado en IFAPA centro El Toruño también ha conseguido invertir las ratios sexuales mediante bajas temperaturas (Manchado, comunicación personal). Esta estrategia es mucho más fácil de implementar en la empresa por su simplicidad. Sin embargo, es necesario establecer el TSP y los efectos causados por la temperatura para evaluar correctamente el impacto sobre el crecimiento y su potencial industrial. Por tanto, establecer el papel de la temperatura sobre la proporción de sexos y los mecanismos que lo regulan es crucial para avanzar en la mejora de las condiciones de producción en lenguado.

A nivel molecular existe abundante información sobre el efecto de la temperatura en la diferenciación sexual. Se conoce que la temperatura modifica la expresión de un panel de genes relacionados con la diferenciación sexual y síntesis de estrógenos de forma muy similar a cómo lo hacen los tratamientos hormonales. Así, las temperaturas que producen un aumento en la expresión del citocromo P450 19A y B (*cyp19a1* y *cyp19b*, respectivamente) y de los receptores de estrógenos (*esr1* y *esr2*) se han correlacionado con una mayor proporción de hembras (Villamizar *et al.*, 2012; Verneti *et al.*, 2013). De hecho, la inhibición de la

aromatasa gonadal durante el período de diferenciación sexual en lenguado provoca que hembras genóticas se desarrollen como machos fenotípicos, lo que indica la importancia de los estrógenos en el desarrollo ovárico (Viñas *et al.*, 2012). Además, estudios controlados con diferentes compuestos con acción estrogénica para inducir feminización han demostrado una reducción en los niveles de transcrito del factor de transcripción doublesex and mab-3 related transcription factor 1 (*dmrt1*), implicado en la diferenciación y receptor de andrógenos aumentando *foxl2* quien participa en la función ovárica y regula la expresión de *cyp19a1* (Verneti *et al.*, 2013). La aplicación de compuestos de acción estrogénica va a modificar la expresión de genes implicados en el crecimiento somático tal como la hormona de crecimiento y sus receptores (*gh* y *ghr*), el factor similar a la insulina tipo 1 y sus receptores (*igf1* e *igf1r*) así mismo receptores tiroideos alfa y beta (*thra1*, *thra2* y *thrb*) (Filby *et al.*, 2007). La monitorización de estos genes será muy útil para evaluar los efectos epigenéticos de las variables en estudio.

Otro factor clave en el efecto de la temperatura son sus consecuencias sobre el estrés. Ante un estímulo estresante, el hipotálamo sintetiza CRH, promoviendo la síntesis del precursor proopiomelanocortina (POMC  $\alpha$  y  $\beta$ ) y la liberación de la hormona adrenocorticotropa (ACTH), la cual activa la biosíntesis de corticosteroides principalmente cortisol. Diversos estudios basados en lenguado de acuicultura han proporcionado niveles plasmáticos elevados de cortisol asociados a una variedad de factores como un largo ayuno, cambio de salinidad, altas densidades de población, xenobióticos y manipulación inadecuada y se ha demostrado que la dexametasona, un potente glucocorticoide es capaz de modular la expresión de la *pomc*. Por tanto, su estudio nos permitirá evaluar las consecuencias de los tratamientos térmicos y su asociación a un posible estrés (Salas-Leiton *et al.*, 2012).

## 1.7 Las malformaciones en lenguado

En la acuicultura, las anomalías esqueléticas son un grave problema económico, ya que reducen el valor de mercado del pescado producido, al verse afectada la morfología y la supervivencia (Koumoundouros *et al.*, 1997). Además, una frecuencia elevada de deformidades a menudo está asociada con la reducción de crecimiento y viabilidad (Hilomen-García, 1997; Kitajima *et al.*, 1994). Las causas subyacentes a las malformaciones pueden ser genéticas o ambientales, principalmente asociadas a factores abióticos tales como inadecuadas condiciones de cría, luz, temperatura (Bengtsson *et al.*, 1998; Polo *et al.*, 1991; Pavlov, 1997; Faustino y Power, 1999) y deficiencias nutricionales en la dieta como los niveles de vitamina A, C y sus precursores (Estévez y Kanazawa, 1995; Takeuchi *et al.*, 1995; Dedi *et al.*, 1998). Además, se han asociado a la presencia de infecciones parasitarias (Taylor *et al.*, 1994).

El lenguado senegalés posee la columna vertebral con 45 vértebras. No obstante, las condiciones de cultivo pueden producir variabilidad en los caracteres morfológicos, entre ellos en el número de vértebras. La columna vertebral está compuesta por diferentes elementos, que incluyen los centros vertebrales, arcos y espinas neurales y hemales, parapófisis y costillas ventrales. El complejo de la aleta caudal está formado por los huesos hipurales (5, 4, 3, 2 y 1); parhipural; epural; centro, arcos y espinas preurales (1, 2 y 3); espina neural y hemal modificada; urostilo y radios de la aleta caudal (Gavaia *et al.*, 2002). Los cultivos larvarios del lenguado son una etapa crítica por las elevadas tasas de crecimiento, coincidentes con una elevada tasa de ingestión de alimento que llega a superar el 100% de la biomasa de las larvas al día (Cañavate *et al.*, 2007). El destete se produce a una edad temprana pudiéndose emplear varios tipos de piensos comerciales (Engrola *et al.*,

2009). Esta etapa es de suma importancia ya que, se determinan algunos de los rasgos más importantes que afectarán a la viabilidad y calidad de la producción, agrupándose en malformaciones anatómicas y fallos en la pigmentación de la piel. Los primeros estudios relacionados con la presencia de malformaciones esqueléticas en *S. senegalensis* cultivados en criadero, hacían alusión a factores como una nutrición deficiente junto con inadecuadas condiciones del medio de cultivo (Gavaia *et al.*, 2002). El método de doble tinción azul alcian y rojo alizarina para cartílago y hueso (Gavaia *et al.*, 2000) permite la visualización de todo el esqueleto durante todo el desarrollo vertebral y la fácil detección de cualquier tipo de deformidad que pudiera existir independientemente de su origen.

La temperatura del agua además de afectar a la supervivencia, crecimiento y desarrollo puede influir en la incidencia y aparición de anomalías morfológicas en el desarrollo larvario (Seikai *et al.*, 1986.; Ottesen y Bolla, 1998; Koumoundouros *et al.*, 2001; Laurel y Blood, 2011). Estudios previos han demostrado que la temperatura tiene un efecto decisivo sobre el tamaño y sobre diferentes eventos ontogénicos como la formación de la aleta caudal y la metamorfosis (Seikai *et al.*, 1986; Polo *et al.*, 1991; Koumoundouros *et al.*, 2001) y se han descrito alteraciones del desarrollo esquelético del pez plano *Pseudopleuronectes herzensteini* durante la metamorfosis en función de la temperatura (Aritaki y Seikai, 2004) o del número de vértebras y composición del esqueleto en el fletán (Lewis-McCrea *et al.*, 2004) en función de la temperatura. En lenguado, la incubación de huevos a diferentes temperaturas modificaba el número total de malformaciones aumentando cuando la temperatura era mayor (Dionisio *et al.*, 2012).

## 1.8 Malpigmentaciones y/o pseudoalbinismo

Las anomalías de despigmentación como albinismo o pseudoalbinismo, son habituales en el cultivo de peces planos resultando en una dificultad para su comercialización. La mayoría de los estudios relacionados con el pseudoalbinismo sugieren una causa nutricional en lugar de una con base genética. Entre otros factores, los desequilibrios nutricionales juegan un papel clave en el desarrollo del esqueleto de peces marinos a edad temprana. Así existen componentes esenciales en la dieta de las larvas para un correcto desarrollo larvario entre los que se encuentran los lípidos, ya que representan la principal fuente de energía para las larvas y son necesarios para síntesis de nuevas formas celulares requeridas para el crecimiento, morfogénesis y formación ósea (Cahu *et al.*, 2003; Izquierdo *et al.*, 2000; Lall y Lewis-McCrea, 2007). Los contenidos nutricionales en n-6 PUFAs sobre la pigmentación, en concreto del ácido araquidónico (ARA) son esenciales para los peces marinos. En el caso de *S. senegalensis* ha sido posible inducir un alto porcentaje de malpigmentaciones con un contenido de ácido araquidónico (ARA) dietario muy superior al que se encuentra en presas naturales (Villalta *et al.*, 2005). Otros factores endocrinos como un hipotiroidismo también podrían aumentar la incidencia de malpigmentaciones en lenguado (revisado en Cerda y Manchado, 2013)

## 1.9 Objetivos

**General:** Efecto de la T<sup>a</sup> durante las primeras fases de desarrollo sobre los parámetros de crecimiento y diferenciación sexual en lenguado *Solea senegalensis*.

**Específico:** Efecto de diferentes regímenes de T<sup>a</sup> aplicados durante el desarrollo larvario según estadio metamórfico, determinando así el período de sensibilidad.

**Fin último del trabajo:** Conseguir un tratamiento que sea fácil y económico de aplicar en la industria mejorando los beneficios de producción.

# **MATERIALES Y MÉTODOS**





## **2. MATERIALES Y MÉTODOS**

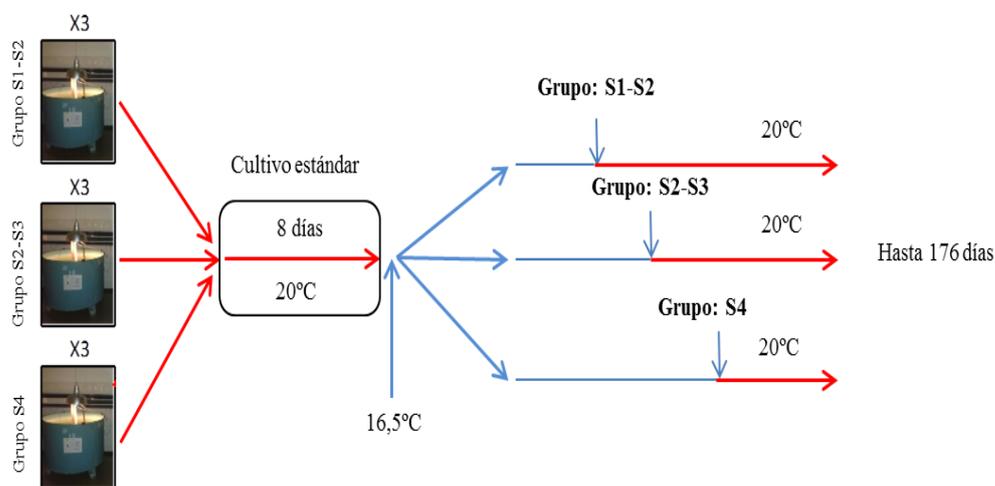
### **2.1 Peces e instalaciones de cultivo**

Las puestas de lenguado fueron suministradas por la empresa CUPIMAR S.A (San Fernando, Cádiz). Los cultivos larvarios se realizaron en las instalaciones de dicha empresa para garantizar la transferibilidad de los mismos en condiciones de producción industrial. La recogida de puestas se realizó durante la mañana. La estimación y valoración de la puesta se realizó mediante separación de huevos flotantes y no flotantes en una probeta graduada considerando aproximadamente 1000 huevos  $\text{ml}^{-1}$ . La puesta seleccionada fue de 300.000 huevos flotantes con una tasa de fecundación del 70%. Las larvas se incubaron en un tanque de 500L a 20°C con aireación suave durante 2 días. A los 2 días tras la eclosión (DPE), se extrajeron las larvas y se cuantificaron con una tasa de supervivencia del 92%. Posteriormente, estas larvas se sembraron en 9 tanques circulares de 400L a una densidad inicial estimada de 60-70 L/litro (número estimado total de larvas por tanque 27.775). En la Fig. 6 se muestra la instalación experimental. El protocolo de cultivo para la alimentación, manejo y fotoperíodo (16L:8D) fue el desarrollado de forma sistemática por la empresa en su rutina de producción similar al de IFAPA. Además se realizó un cultivo control a 20°C pero en tanques de 5m<sup>3</sup>, por duplicado para las ratios de machos y hembras. Estos tanques sólo se evaluaron al final y no se le hizo seguimiento de crecimiento ya que los tanques tenían diferentes características.

### **2.2 Diseño experimental**

El cultivo se realizó a una temperatura de 20°C hasta los 8 DPE (Fig. 5). Posteriormente, se le bajó la temperatura a todos los tanques hasta conseguir 16,5°C en un período de 12 horas. A partir de ese momento, se realizó el cultivo a esta

temperatura considerando 3 grupos experimentales según tratamiento térmico. En el grupo S1-S2 se mantuvo la temperatura fría hasta que más del 50% de la población alcanzó el estadio metamórfico poblacional entre S1-S2; el grupo S2-S3 hasta que más del 50% de la población alcanzó el estadio metamórfico poblacional S2-S3; y el grupo S4, hasta que más del 50% de la población finalizó la metamorfosis. Al final de los 30 DPE se estimó la tasa media de supervivencia larvaria. Todos los grupos fueron realizados por triplicado. Posteriormente, al día 35 DPE y para favorecer los destetes, los tres tanques de cada grupo se juntaron en tanques de mayor dimensión con un volumen de 2.000L (8m<sup>2</sup> de superficie) para realizar los destetes y los estudios de preengorde continuando los cultivos hasta los 176 días y determinar la proporción de sexos poblacional en cada tratamiento. Así mismo se cuantificó la tasa de supervivencia al destete a día 44 y 176 DPE.

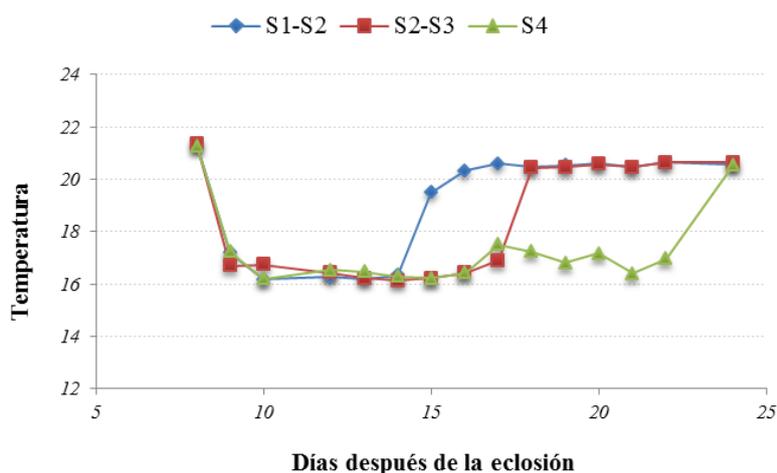


**Figura 5. Diseño experimental.**

Se indican los tres grupos experimentales: S1-S2, S2-S3 y S4. El cultivo se hizo por triplicado en cada condición experimental. Se cultivó a 20°C hasta el día 8 DPE y posteriormente se redujo la temperatura a 16,5°C hasta que la media del tanque alcanzaba los estadios metamórficos S1-S2, S2-S3 y final de la metamorfosis (S4) a particular del cual se consignó la temperatura de trabajo de 20°C para los tanques de cultivo.

Para conseguir las temperaturas deseadas había que considerar que la temperatura de trabajo en la planta industrial era de 20°C y se disponía de una doble tubería a 14°C y 20°C. Las temperaturas se consiguieron mediante mezcla de agua

hasta alcanzar las temperaturas de consigna. Diariamente se controlaron los parámetros de salinidad, O<sub>2</sub> y temperatura. La salinidad media fue de 38,3 ppt y el oxígeno de 7,9 mg/l. Para monitorizar las temperaturas, además del registro manual de los parámetros físico-químicos mediante oxímetro se introdujeron unas sondas de registro automático (HOBO). Para compensar las pérdidas térmicas fue necesario incrementar la renovación de agua hasta 2-3 renovaciones día. En la Fig. 6 se muestra la media de la temperatura para los tres grupos experimentales así como el momento en el que se cambiaron las temperaturas. Para el grupo S1-S2 el tratamiento duró hasta el día 14, para el grupo S2-S3 hasta el día 17 y para el grupo S4 hasta el día 23 posterior a la eclosión.



**Figura 6. Tratamientos térmicos aplicados durante el experimento.**

En azul, se indica las temperaturas medias registrado para los tanques de la condición S1-S2, en rojo para S2-S3 y en verde para S4. Sólo se muestra un registro por día para simplificar la gráfica.

### 2.3 Determinación del crecimiento larvario

A lo largo del experimento se llevaron a cabo varios muestreos con finalidades diferentes. Los muestreos de peso seco para determinar el crecimiento larvario se realizaron los días 7, 14, 16, 18, 19, 20, 21, 22, 24 y 30 DPE. Para ello, el peso seco (g) se determinó tomando 20 larvas al azar de cada tanque, con ayuda de

un sifón. Posteriormente se eutanasiaron con MS-222 (Tricafina Metanosulfonato) ( $400\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ). Una vez sacrificadas, las larvas se lavaron con agua destilada sobre un filtro de  $300\mu\text{m}$  para eliminar la mayor cantidad de material residual y sales, se colocaron sobre cubreobjetos previamente secados y tarados y se mantuvieron en la estufa durante 48 horas. Tras este período, se colocaron en un desecador durante 30 minutos para eliminar la máxima cantidad de humedad posible antes de su pesaje.

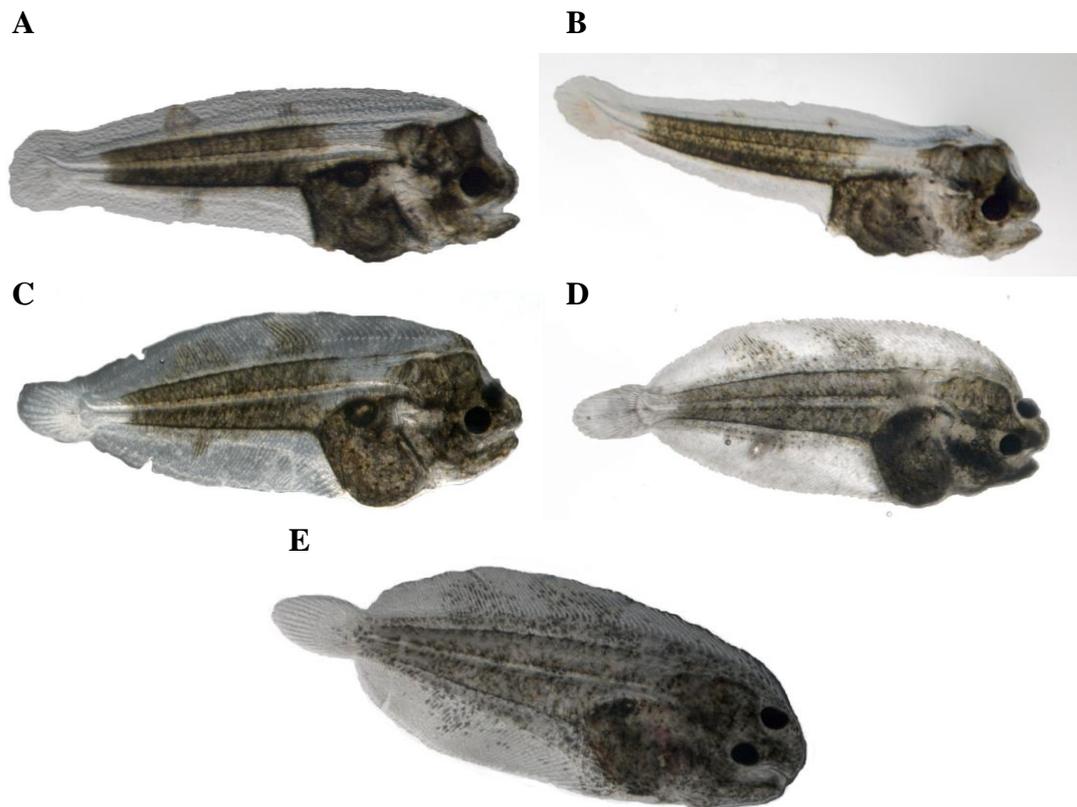
Para el cálculo de peso seco se utilizó la fórmula:

$$[(\text{Peso final de muestra } 1 + \text{Peso blanco}) - \text{Peso inicial de muestra } 1 / \text{número de larvas}]$$

En la que el peso blanco es una corrección según la fórmula:

$$[\text{Peso blanco} = \text{Peso final} - \text{Peso inicial}]$$

#### 2.4 Determinación del índice metamórfico



**Figura 7. Estadios metamórficos de *S. senegalensis* según Fernández-Díaz *et al.*, 2001.**  
A-Estadio S0. B- Estadio S1. C-Estadio S2. D- Estadio S3. E- Estadio S4. Fotografías realizadas a 1 aumento por B. Lorenzo, 2013.

Para el seguimiento de la metamorfosis, se estimó el índice metamórfico los días 12, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22 y 24 DPE. Los estadios metamórficos se estimaron según Fernández-Díaz *et al.*, 2001. Este paso era un punto crítico en el experimento ya que el estadio metamórfico poblacional definía la finalización de los tratamientos térmicos. Al igual que en el peso seco, se tomaron 20 larvas al azar de cada tanque con ayuda de un sifón, posteriormente fueron sacrificadas con MS-222, y se clasificaron de forma individual en una lupa binocular a un aumento. El cálculo del índice metamórfico fue realizado con la siguiente fórmula:

$$[(S0x0) + (S1x1) + (S2x2) + (S3x3) + (S4x4)]/\text{número total de larvas}$$

La clasificación del estadio metamórfico se puede visualizar en la Fig. 7.

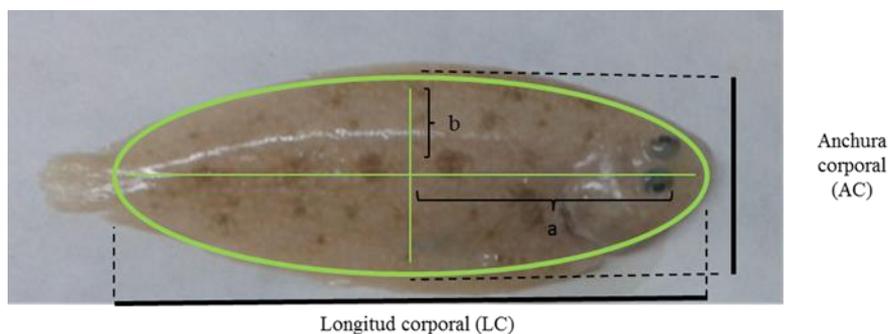
## **2.5 Crecimiento después de la metamorfosis**

En cuanto a los muestreos de animales tras la metamorfosis, se determinó la longitud y peso escurrido a los días 44, 65, 79, 99, 113, 133, 142 y 176 DPE. Los pesos se midieron en una balanza Sartorius y la longitud con una regla graduada en cm. El número de individuos muestreados se encuentran detallados en la Tabla IV. Los animales se muestrearon al azar para cada tanque con ayuda de un salabar, sacrificándose con MS 222 (Metanosulfonato de triclaína), se realizaron lavados con agua dulce y destilada para retirar sales, cloro y posibles residuos, se secaron con papel de filtro y se calculó su peso escurrido (g), longitud y anchura. La anchura sólo se midió al final del experimento. En la determinación de la longitud furcal (cm) y anchura corporal (cm), se tuvo en cuenta el plano sagital del lenguado obviando las aletas dorsal, anal y caudal (Fig. 8).

**Tabla IV. Número de animales muestreados para cada edad y tratamiento.**

	44d	65d	79d	99d	113d	133d	142d	176d
G. S1-S2	19	50	40	17	19	51	73	180
G. S2-S3	19	42	40	25	79	20	78	226
G. S4	18	48	40	28	65	50	65	170

Los muestreos para determinar la incidencia de malpigmentaciones se realizaron los días 65, 79, 99, 113, 133, 142 y 146 DPE. Para realizar el sexaje de los animales hubo que esperar hasta el día 142 DPE, ya que al tratarse de animales sexualmente inmaduros y de pequeña talla una clasificación anterior hubiese sido poco estimable, realizándose dos muestreos a día 142 y 176 tras la eclosión. Las malformaciones esqueléticas se observaron en larvas recogidas el día 44 después de la eclosión. Los muestreos para el análisis de genómica se realizaron en los días 7, 14, 16, 18, 20, 22 y 24 después de la eclosión.



**Figura 8. Representación de las medidas de longitud y anchura corporal del plano sagital del lenguado senegalés y los semiejes.** Las letras a y b representan los semiejes corporales del lenguado. Se indica la anchura (AC) y longitud corporal (LC).

## 2.6 Cuantificación de parámetros productivos

### 2.6.1 Estimación de parámetros biométricos

Para la obtención de las tasas de crecimiento específico o SGR para cada grupo experimental se utilizó la fórmula

$$SGR = 100 [\ln (W_f) - \ln (W_i)] / t$$

Dónde  $W_f$  y  $W_i$  corresponden a la media aritmética del peso final e inicial de cada período analizado respectivamente,  $t$  es el número de días que conforman un período.

### 2.6.2 Parámetros de calidad morfológica

Los parámetros de calidad morfológica, excentricidad y elipsidad, también fueron calculadas asumiendo una morfología corporal del lenguado elipsoidal. Las fórmulas aplicadas fueron:

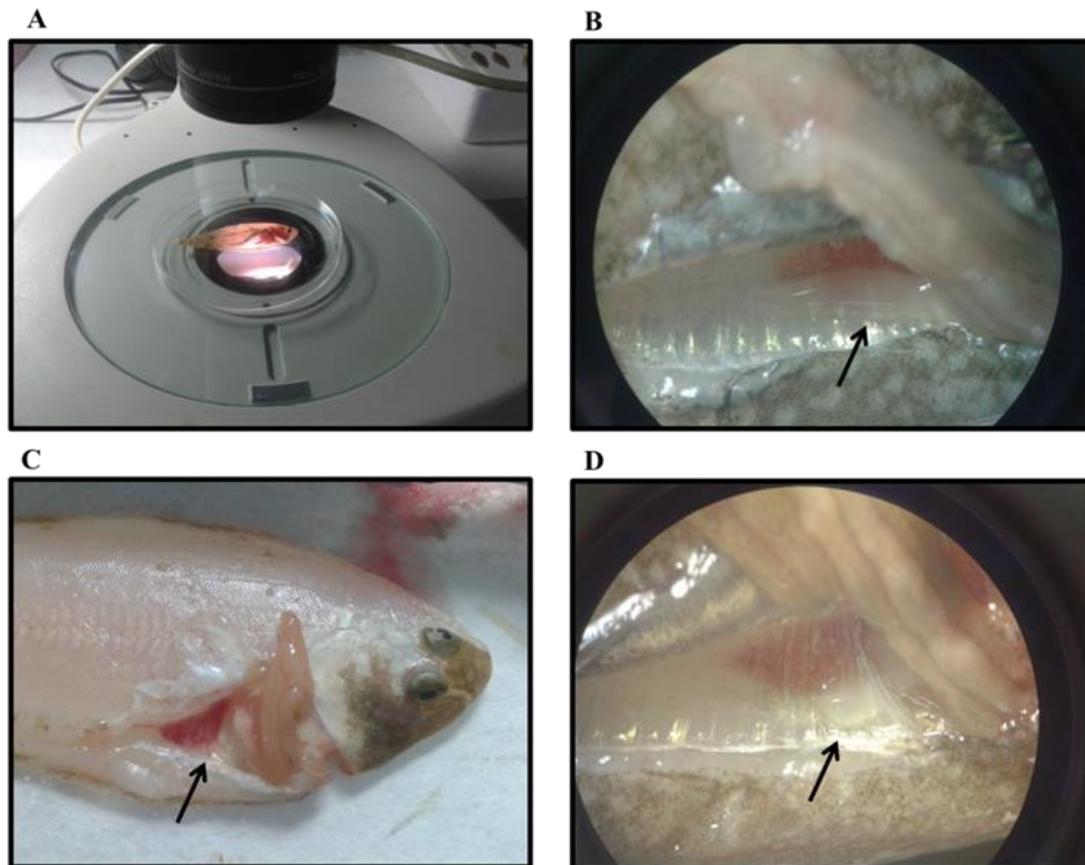
$$\text{Excentricidad} = \sqrt{\frac{(\text{AC}/2)^2 + (\text{LC}/2)^2}{(\text{LC}/2)}}$$
$$\text{Elipsidad} = \frac{(\text{LC} - \text{AC})}{(\text{LC} + \text{AC})}$$

Dónde LC y AC representan la longitud corporal y la anchura corporal en la morfología del lenguado respectivamente (Fig. 9). Valores cercanos a 1 tanto de excentricidad como de elipsidad representan una morfología alongada mientras que valores cercanos a 0 formas más circulares, el número de animales muestreados para cada edad y tratamiento se puede observar en la Tabla IV.

### 2.7 Estimación de la ratio de sexos

Los muestreos para la determinación del sexo fueron realizados los días 142 y 176 DPE, en cada tratamiento, tomando para el grupo S1-S2  $n=317$ , grupo S2-S3  $n= 386$  y grupo S4  $n=327$ , tomando las muestras al azar con ayuda de un salabar. Los animales fueron sacrificados con MS-222 y posteriormente se procedió a su sexaje. Para ello se realizó una primera incisión paralela al opérculo, comenzando en la zona craneal hacia la zona ventral, continuando con una incisión en la zona abdominal

perpendicular a la anterior, posteriormente se retiró la capa muscular junto con el paquete intestinal y órganos próximos, visualizando según se tratara, la gónada femenina o masculina con ayuda de una lupa binocular a 1 y 2 aumentos. Además, se realizaron muestreos de un tanque control donde lenguados (*S. senegalensis*) fueron cultivados durante todo su desarrollo a una temperatura de 20°C (n=212).

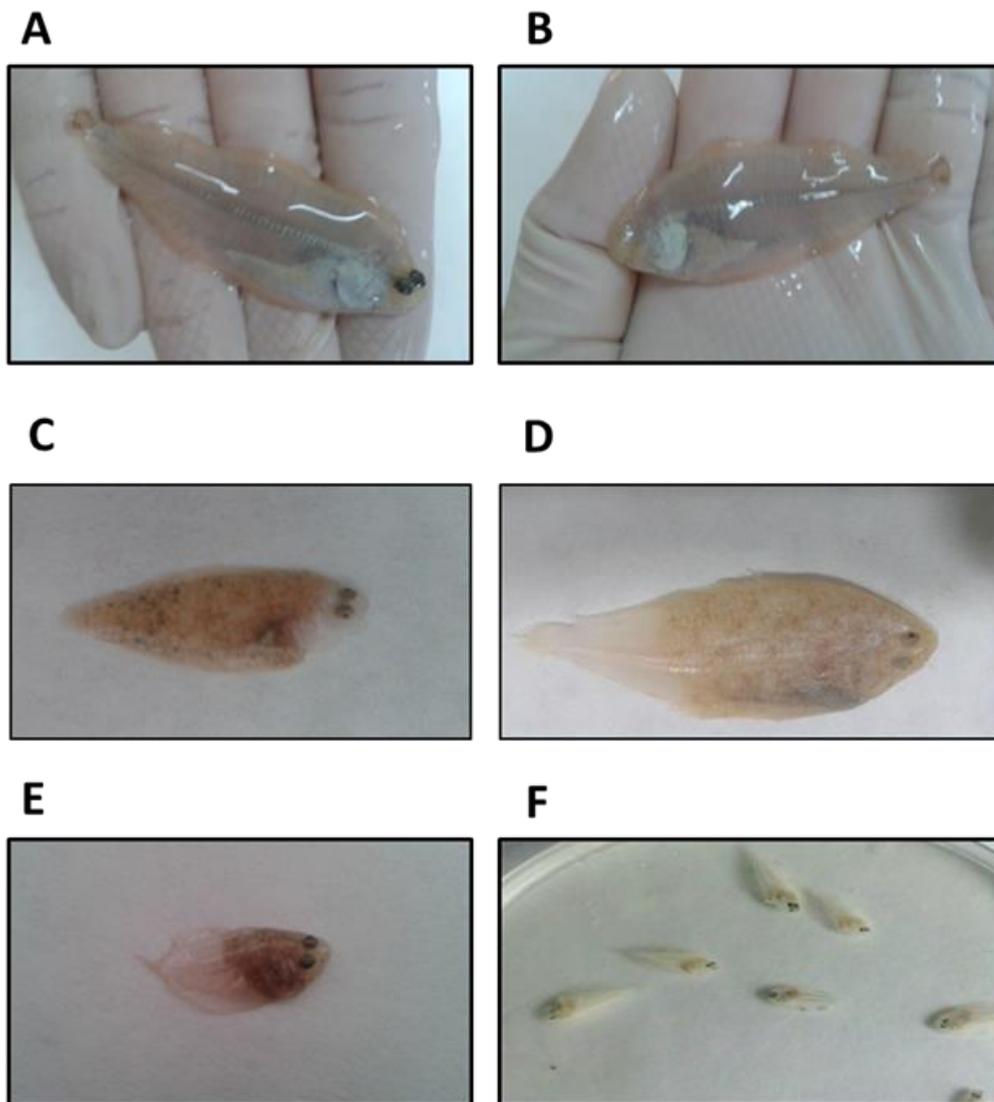


**Figura 9. A- Visualización de gónadas en lupa binocular. B- Gónada femenina (ovario) en la cavidad abdominal de *S. senegalensis*. C- Gónada femenina en la cavidad abdominal de *S. senegalensis* malpigmentado. D- Gónada masculina (testículo) en la cavidad abdominal de *S. senegalensis*. Fotografías realizadas por B. Lorenzo, 2014.**

Las diferencias entre gónadas masculina y femenina son muy evidentes a nivel anatómico, apreciándose en la Fig. 9 la pequeña ocupación que el testículo representa en la cavidad abdominal respecto al ovario.

## 2.8 Pigmentación

Para determinar la incidencia de malpigmentaciones, se realizaron muestreos al azar en los días 44, 65, 79, 99, 113, 133, 142, 176 DPE, (Tabla IV). Además, se calcularon los parámetros biométricos: peso (g), longitud furcal (cm) y anchura (cm). Al considerar si existía una asociación entre el sexo y la malpigmentación, se sexaron los animales malpigmentados muestreados a 176 DPE (n=28). Además a la edad de 224 DPE, se hizo un segundo muestreo y sexaje de animales malpigmentados para determinar su relación con el sexo n=111. Para ello, los animales malpigmentados se tomaron al azar con ayuda de un salabar y se sacrificaron con MS-222 y posteriormente se procedió a su sexaje. Realizándose una primera incisión paralela al opérculo, comenzando en la zona craneal hacia la zona ventral, continuando con una incisión en la zona abdominal perpendicular a la anterior, posteriormente se retiró la capa muscular junto con el paquete intestinal y órganos próximos, visualizando según se tratara, la gónada femenina en el caso de la hembra y la gónada masculina en el caso del macho, con ayuda de una lupa binocular a 1 y 2 aumentos, mismo protocolo utilizado y mencionado anteriormente en poblaciones no albinas. En la Fig. 10 se muestran ejemplos de diferentes estados de despigmentación de individuos estudiados.

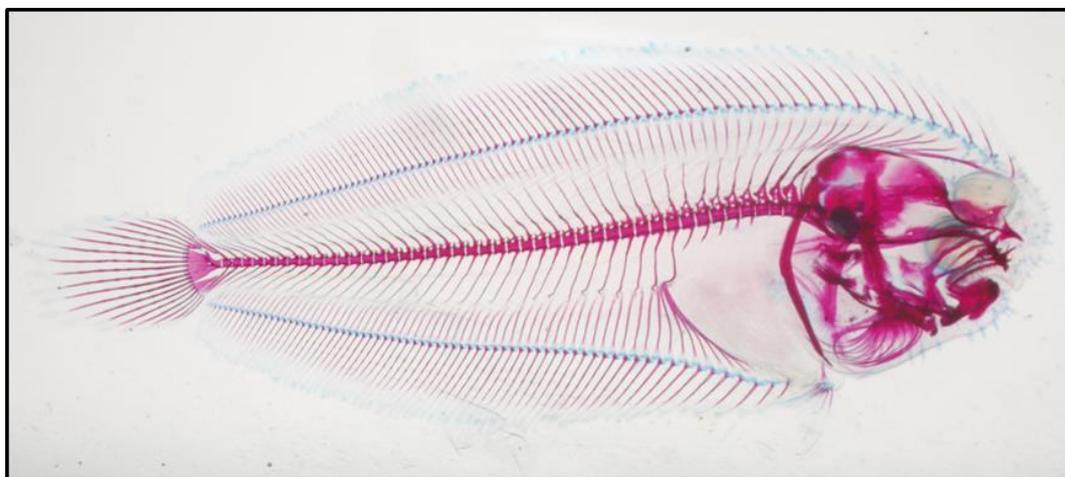


**Figura 10. Alevines *S. senegalensis* con diferentes tipos de malpigmentación.** A, B y F muestran despigmentación total, mientras que C, D y E muestran despigmentación parcial. Fotografías realizadas por B. Lorenzo, 2014.

## 2.9 Evaluación de malformaciones

Para determinar la incidencia de malformaciones según tratamiento, el 44 DPE, se muestrearon animales (Tabla VIII) y se fijaron en paraformaldehído al 4% para posteriormente realizar la tinción rojo alizarina - azul alcán y diferenciar el cartílago y hueso de cada larva. Las muestras fueron tomadas al azar de cada condición térmica a la que fueron sometidas previamente (cultivo a 16,5°C hasta

estadio S1-S2; S2-S3 y S4). La técnica se realizó según lo descrito por Gavaia y cols (2000) y las imágenes se procesaron mediante el programa imageJ. En la Fig. 11, se muestra una foto tipo utilizada para el recuento de vértebras y de malformaciones.



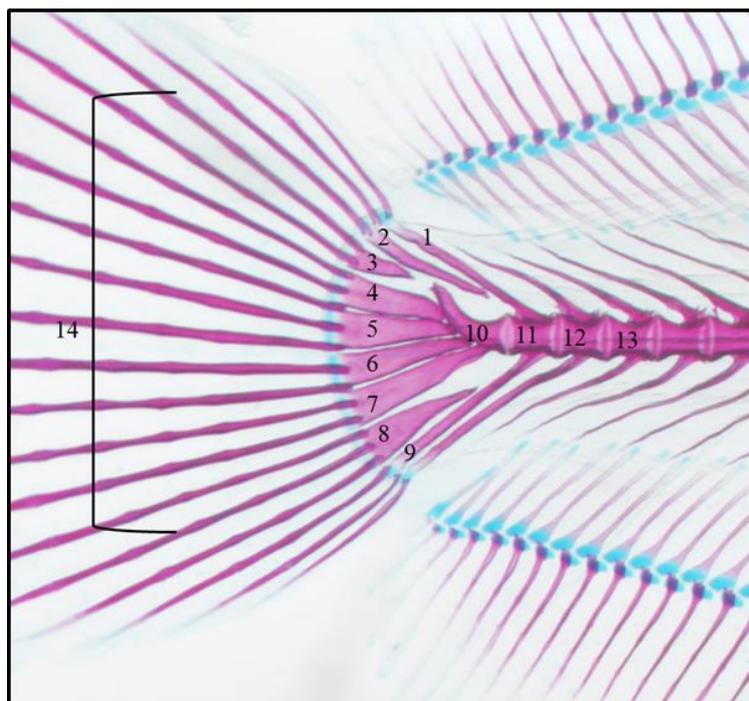
**Figura 11. Lengado teñido con la técnica de doble tinción.** La imagen corresponde a un lengado de 44DPE a 0,8 aumentos teñido con la técnica de doble tinción de cartílago y hueso con rojo alizarina y azul alcian. Fotografía realizada por B. Lorenzo, 2014.

Tras la realización de la doble tinción, se procedió al recuento del número total de vértebras, número de vértebras prehemales y número de vértebras hemales de cada individuo según la condición de temperatura a la que fueron sometidos, además de la determinación de posibles malformaciones. En este trabajo se cuantificaron las malformaciones más comunes presentes en *S. senegalensis* del complejo de la aleta caudal (malformaciones de hipurales 1, 2, 3, 4 y 5; epural; parhipural; vértebra preural 1, 2 y 3; espina neural modificada; espina hemal modificada; radios de la aleta caudal) y columna vertebral (malformaciones presentes en las vértebras prehemales; hemales y componentes adyacentes) según Gavaia y cols (2002), realizándose una clasificación del porcentaje de individuos con presencia o ausencia de malformaciones, según el tratamiento térmico que les fue aplicado. En la Fig. 12, 13 y Fig. 14 se muestra un lengado albino con malformaciones evidentes de

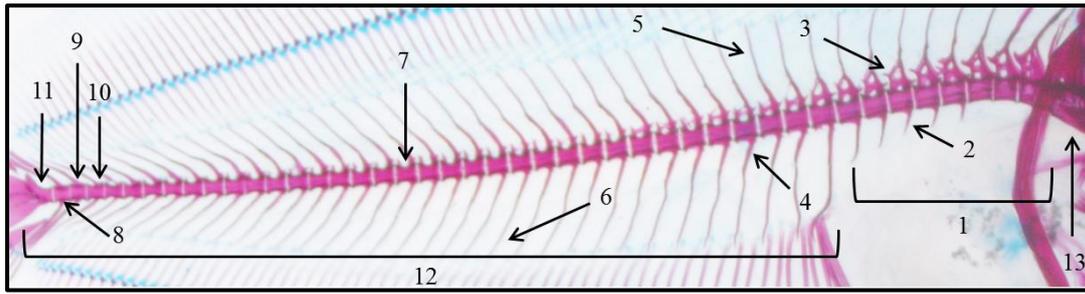
escoliosis, las principales características anatómicas de la aleta caudal y columna vertebral, respectivamente.



**Figura 12. Lengado (*S. senegalensis*) albino con escoliosis.**  
Fotografía realizada por B. Lorenzo, 2014.



**Figura 13. Visualización del complejo de la aleta caudal de *S. senegalensis* de 44 días de edad.** 1- Espina neural modificada. 2- Epural. 3- Hipural 5. 4- Hipural 4. 5- Hipural 3. 6- Hipural 2. 7- Hipural 1. 8- Parhipural. 9- Espina hemal modificada. 10- Urostilo. 11- Vértebra preural 1. 12- Vértebra preural 2. 13- Vértebra preural 3. 14- Radios de la aleta caudal. Imagen tomada a 2 aumentos.



**Figura 14. Visualización de la columna vertebral de *S. senegalensis* de 44 días de edad.**  
 1- Vértebras prehemales. 2- Parapófisis 3- Arco neural. 4- Arco hemal. 5- Espina neural. 6- Espina hemal. 7- Cuerpo vertebral. 8- Vértebra preural 1. 9- Vertebra preural 2. 10- Vértebra preural 10. 11- Urostilo. 12- Vértebras hemales. 13- Basioccipital articulatorio. Imagen tomada a 1 aumento por B. Lorenzo, 2014.

## 2.10 Análisis de expresión génica

Los muestreos para análisis de genómica se realizaron los días 7, 14, 16, 18, 20, 22 y 24 DPE. Se tomaron 20 larvas al azar de cada tanque con ayuda de un sifón, se lavaron en primer lugar con agua Milli-Q y en segundo lugar con agua DEPC (Dietil pirocarbonato), conservándose cada muestra en tubos eppendorf con nitrógeno líquido hasta completar todo el muestreo, finalmente se almacenaron en el congelador a  $-80^{\circ}\text{C}$  para posteriormente estudiarlas.

Para el aislamiento del ARN total se utilizó el RNeasy Mini Kit (Qiagen) siguiendo el protocolo establecido por el fabricante. La homogenización de las células (aprox 30-40 mg) se realizó en el FatsPrep® - 24 (MP Biomedicals) durante 40 segundos a una velocidad de 6 m/s. Las muestras de tejido se resuspendieron en el tampón de lisis y  $10\mu\text{L}$  de TCEP.HCl 1M y posteriormente se rompieron en las columnas Lysing Matrix D (MP Biomedicals) tal como se indicó más arriba. Todas las muestras se trataron dos veces con RNase-Free DNase (Qiagen) para eliminar los restos de ADN genómico. Para evitar la presencia de ribonucleasas, los materiales utilizados (puntas para pipetas y tubos para microcentrífuga o PCR) fueron esterilizados dos veces en el autoclave ( $120^{\circ}\text{C}/20$  minutos). Para comprobar la

calidad del ARN extraído, las muestras se cargaron en un gel de agarosa al 1% en tampón TAE 1X. La cuantificación del ARN se llevó a cabo en un espectrofotómetro NanoDrop 8000 (Thermo Scientific). El ARN se conservó a -80°C hasta el momento de su utilización.

Para la síntesis de ADNc mediante RT, se utilizó el kit iScript™ cDNA Synthesis (Bio-Rad) siguiendo las instrucciones del fabricante. Los componentes de la reacción de síntesis fueron 1µg de ARN total, la enzima iScript Rnase H+ MMLV reverse transcriptase, la mezcla de reacción 5X constituida por cebadores poli (T) y hexámeros de secuencias aleatorias. Después de incubar la mezcla de reacción durante 5 minutos a temperatura ambiente y 30 minutos a 42°C, se procedió a inactivar la enzima a 85°C durante 5 minutos. Con el ADNc sintetizado se llevó a cabo la PCR estándar o la PCR a tiempo real.

La PCR a tiempo real se llevó a cabo en el termociclador CFX96™ Real-Time System C1000™ Thermal Cycler (Bio-Rad), acoplado a unidades ópticas capaces de detectar la fluorescencia. La reacción final se realizó en un volumen final de 10µL compuesta de 5µL de Mix SYBR® Premix Ex Taq™ (Takara), 2,6µL de agua, 0,2µL de cada oligonucleótido y 2µL de ADNc diluido 1/10. Los cebadores específicos que se utilizaron para la amplificación de los genes diana se describieron previamente para la *tgb*, *tshb*, *thrb*, *pomcb* (Manchado *et al.*, 2008a; Manchado *et al.*, 2009, Salas-leiton *et al.*, 2012). Para *dnmt1*, *era*, *dmrt1* y *cyp19a1* se diseñaron con el programa Oligo v6.89 (Medprobe) a partir de las secuencias obtenidas del ensamblaje de *novo* de SoleaDB (Tabla V). El protocolo de amplificación fue el siguiente: desnaturalización inicial durante 15 minutos y activación de la enzima a 95°C, 40 ciclos de 30 segundos a 95°C, 15 segundos a 68°C y 1 minuto a 72°C. Por

cada muestra experimental a analizar se realizó una PCR por duplicado. Para el análisis de los datos se realizó la cuantificación relativa  $2^{-(\Delta\Delta Ct)}$  según lo descrito por (Livak y Schmittgen, 2001). En nuestro caso se utilizaron los genes de referencia factor de elongación 1a (*ef1a*) y ubiquitina (*ub52*) (Infante *et al.*, 2008b).

**Tabla V. Genes a estudiar mediante qPCR en este estudio. Se indica el nombre del gen, el tamaño de amplicón y los cebadores usados.**

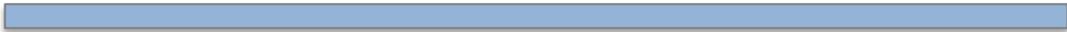
Genes	Nombre del gen	Amplicón (pb)	Cebador (5'→3')
Receptor de estrógenos alfa	<i>era</i>	141	GATGATGGTAGTCGTCAGTCCCTGGGCAGT GGACCTGTAGACGGGTGTTGCAGTGGTTT
ADN (citosina-5)-metiltransferasa 1	<i>dnmt1</i>	132	GCCGTCAAGTCACCGACCGCTCCTAA CATTGACAAGATGGTTGGCTGTTTCCCACT
Aromatasa gonadal	<i>cyp19a1</i>	124	TCCCTCGTCGTCACTTCCAGCCGTTT TGGAGACACATTGAGAACTGCGAGAGCAAC
Doublesex and mab-3 related transcription factor 1	<i>dmrt1</i>	112	ACCGCCCAGAATGCCCAAATGCT TTTGCACCTTGAGACACTGGCAGTCCTTC

## 2.11 Estadística

Todos los test estadísticos se realizaron con el paquete estadístico SPSS v20 y Prismv5. Antes de aplicar un test paramétrico se confirmó el ajuste a la normalidad mediante un test de Kolmogorov-Smirnov. Además, cuando fue necesario se aplicó una transformación logarítmica. Para el análisis del peso en los cultivos larvarios se realizó una ANOVA considerando como efectos fijos el tratamiento térmico y como covariable la edad. Para el análisis del peso y longitud, anchura, excentricidad y elipsoidad se realizó una ANOVA consideran los factores fijos del sexo, tratamiento térmico y albinismo. Para el análisis de expresión génica se realizó una ANOVA de doble vía incluyendo la edad y tratamiento como factores fijos. En todos los casos significativos se realizó un test post-hoc Tukey. Cuando fue necesario se realizó una ANOVA por edad. Para testar las frecuencias de sexos poblaciones, de

malpigmentaciones, malformaciones se utilizó una chi-cuadrado. Los grupos fueron considerados significativamente diferentes para  $p < 0,05$ .

# RESULTADOS

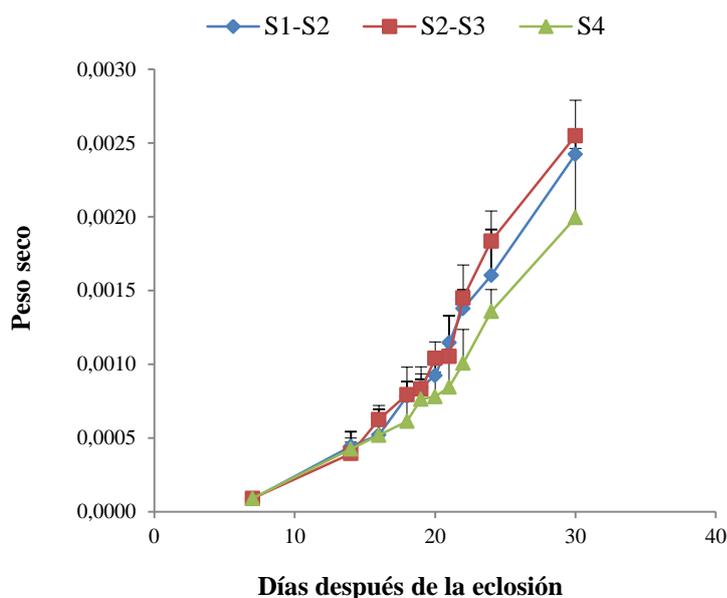




### 3. RESULTADOS

#### 3.1 Efecto de los tratamientos de temperatura sobre el crecimiento y metamorfosis en fase larvaria

Con el objetivo de estudiar el efecto de los tratamientos de temperatura sobre el crecimiento del lenguado en fase larvaria y sobre la metamorfosis, se determinó el peso e índice metamórfico. Los datos de peso seco se indican en la Fig. 15. Las larvas expuestas al tratamiento S4 (temperatura fría de 16,5°C hasta el estadio metamórfico poblacional S4) presentaron un crecimiento significativamente menor a los otros dos tratamientos ( $F=7,129$ ;  $p<0,001$ ).

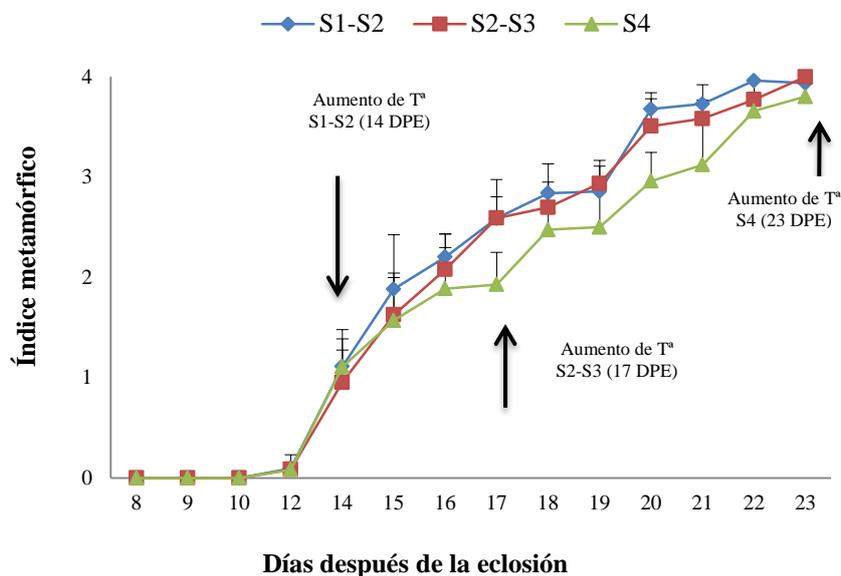


**Figura 15. Crecimiento de las larvas de lenguado según tratamiento.**

Se indica la media de peso seco (g)  $\pm$  desviación típica. En azul se indica el grupo S1-S2, en rojo el S2-S3 y en verde, S4.

Respecto a la metamorfosis (Fig. 16), todas las larvas empezaron la metamorfosis simultáneamente hacia el día 12 tras la eclosión (DPE). Al grupo S1-S2 se le aumentó la temperatura al día 14, el grupo S2-S3 al día 17 y al S4 el día 23. El desfase en los incrementos de temperatura entre los grupos S1-S2 y S2-S3 no

influyó en la evolución de la metamorfosis, no encontrando diferencias significativas entre ellos. En cambio, las larvas a las que se le aplicó el tratamiento S4 presentaron un retraso significativo en el desarrollo de la metamorfosis ( $F=5,853$ ;  $p<0,004$ ).



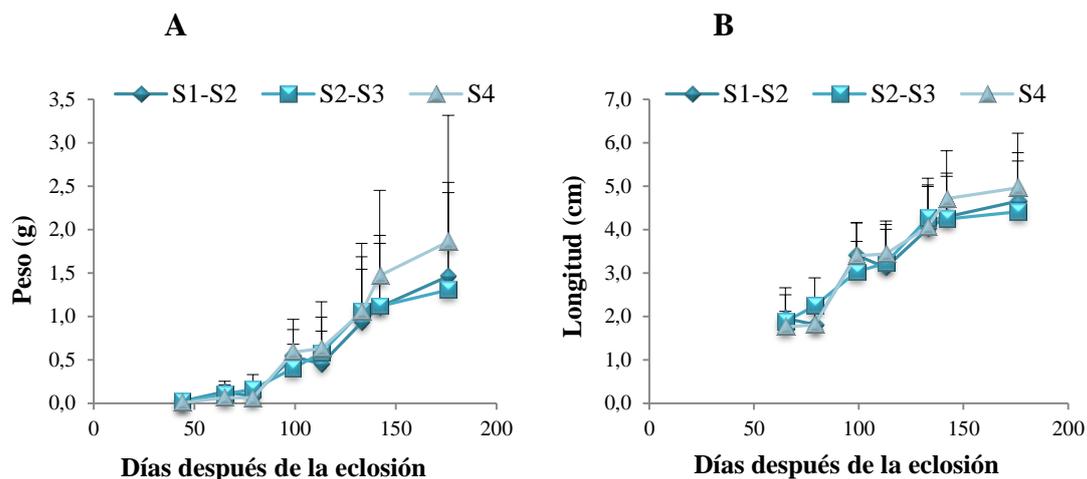
**Figura 16. Índice metamórfico para los tratamientos térmicos aplicados.** Se indica el valor medio  $\pm$  desviación típica para cada tratamiento así como el momento en el que cambió la temperatura a cada grupo experimental. En azul se indica el grupo S1-S2, en rojo el S2-S3 y en verde, S4.

Al final de los 30 DPE, la tasa media estimada de supervivencia larvaria fue muy similar sin diferencias significativas en los tratamientos S1-S2 y S4, con un 48,8% y 47,2% respectivamente, mientras que fue significativamente inferior en el tratamiento S2-S3 (35,6%).

### 3.2 Evaluación de crecimiento, morfología, pigmentación y ratio de sexos en las poblaciones de alevines

Tras la finalización de los cultivos larvarios los animales se dispusieron por tratamiento en bandejas adaptadas al alevinaje de lenguado para su destete y preengorde. La supervivencia al destete a 44 DPE fue de un 72,3% en el grupo S1-S2, un 49,9% en S2-S3 y 32,2% en S4 sin diferencias significativas. Para normalizar

la población de lenguados en los tanques de preengorde se establecieron densidades similares entre 1.738 y 2.040 lenguados por m<sup>2</sup> y con un rango de animales de 12.635 y 14.767, respectivamente. Los datos de peso medio se indican en la Fig. 17A. Al inicio de la fase de preengorde (44 días DPE), los animales del tratamiento S4 presentaban un valor medio de peso significativamente menor (0,008 g) a los grupos S1-S2 y S2-S3 (0,026g en ambos;  $p < 0,05$ ). Sin embargo al final del período experimental el grupo S4 tuvo mayor peso medio (1,86 g frente a 1,5 g y 1,3 g de los grupos S1-S2 y S2-S3, respectivamente) sin diferencias significativas. No hubo diferencias en la supervivencia a 176 días entre los grupos experimentales (rango 78-83%). Para la longitud (Fig. 17B), se observó un resultado similar al peso, observando que los lenguados del grupo S4 presentaban mayor longitud media ( $5,0 \pm 1,3$  cm frente a  $4,7 \pm 1,1$  cm del grupo S1-S2 y  $4,4 \pm 1,2$  cm del grupo S2-S3). Los datos de SGR (Tabla VI) mostraron un crecimiento compensatorio del grupo S4 con tasas significativamente superiores de crecimiento hasta el día 142. En el último período (142-176) la SGR del grupo S4 fue similar a los otros dos grupos sin diferencias significativas (0,46-0,81).

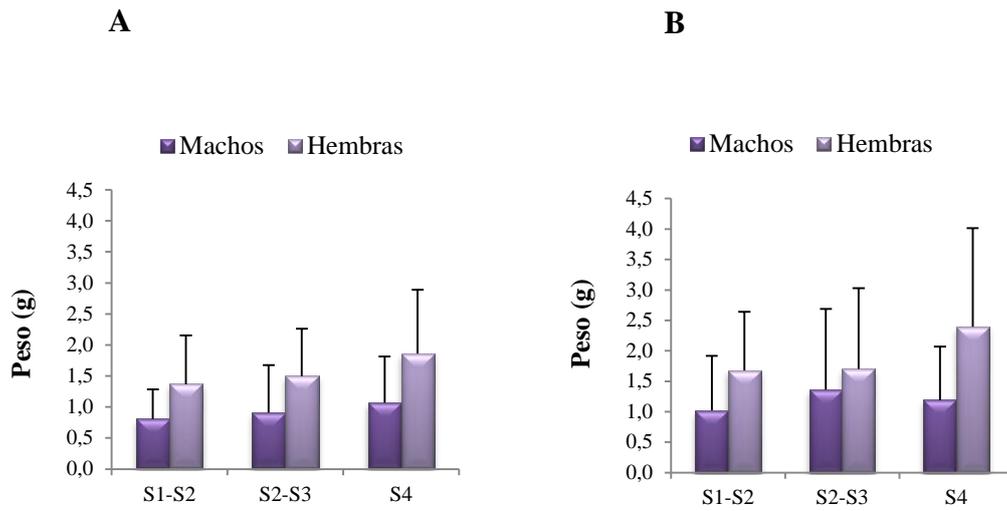


**Figura 17. Peso (A) y longitud (B) medias durante el preengorde según grupo experimental.** Se muestra el peso medio (A) y longitud media (B)  $\pm$  desviación estándar de individuos juveniles según el tratamiento de temperatura aplicado. Los rombos indican S1-S2, los cuadrados, S2-S3 y los triángulos, S4.

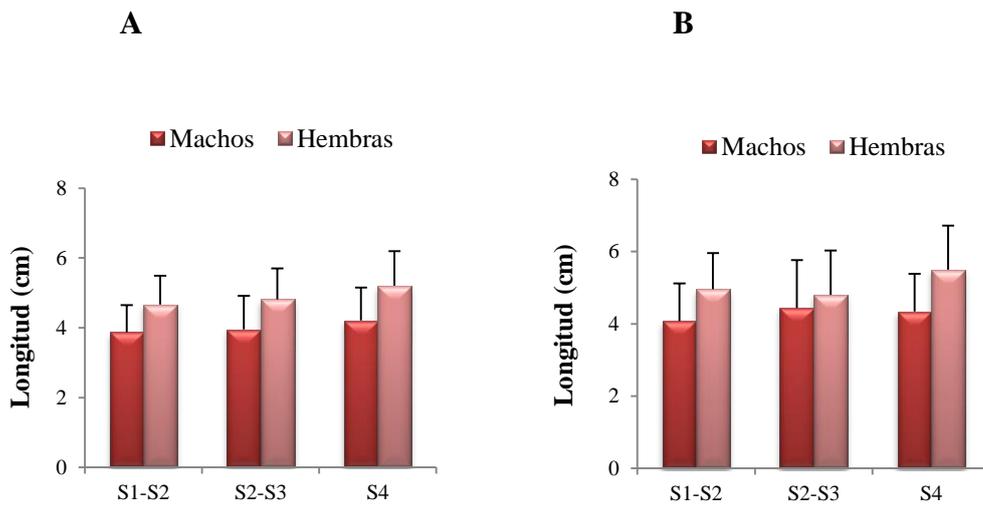
**Tabla VI. SGR por periodos para cada tratamiento de temperatura.**

	SGR								
	44-65	44-79	44-99	44-113	44-133	44-142	44-176	133-176	142-176
<b>S1-S2</b>	7,75	3,24	5,53	4,14	4,03	3,83	3,05	1,04	0,81
<b>S2-S3</b>	6,76	5,23	4,98	4,49	4,16	3,83	2,96	0,48	0,46
<b>S4</b>	9,88	5,81	7,76	6,28	5,44	5,29	4,10	1,33	0,69

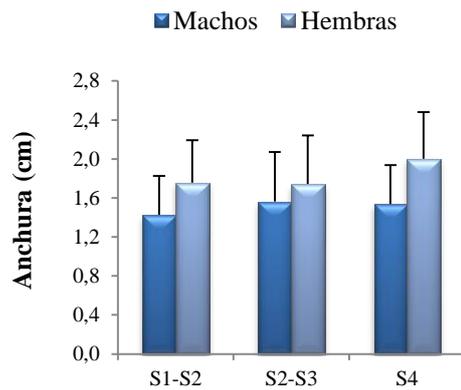
Al evaluar los parámetros biométricos según sexo, las hembras siempre presentaron mayor peso, longitud y anchura que los machos en los tres tratamientos a día 142 y 176 (Fig. 18, 19 y 20). A día 142, el peso medio de los machos para los tres grupos experimentales fue de  $0,9 \pm 0,7$  g y para las hembras de  $1,6 \pm 0,9$  g. A día 176, el peso medio de los machos fue de  $1,1 \pm 1,0$  g y para las hembras de  $1,8 \pm 1,3$  g. Respecto a la longitud, la longitud media de los machos fue de  $4,0 \pm 0,9$ cm y para las hembras de  $4,9 \pm 0,9$  cm a día 142 mientras que a día 176 la longitud media de los machos fue de  $4,2 \pm 1,1$ cm y para las hembras de  $5,0 \pm 1,1$  cm. Respecto a la anchura, en los machos fue de  $1,5 \pm 0,4$  cm y en las hembras de  $1,8 \pm 0,5$  cm al día 176.



**Figura 18. Peso según sexo y grupos experimentales.**  
Se muestra el peso medio  $\pm$  desviación estándar. A- Edad de 142 DPE. B- Edad de 176 DPE.

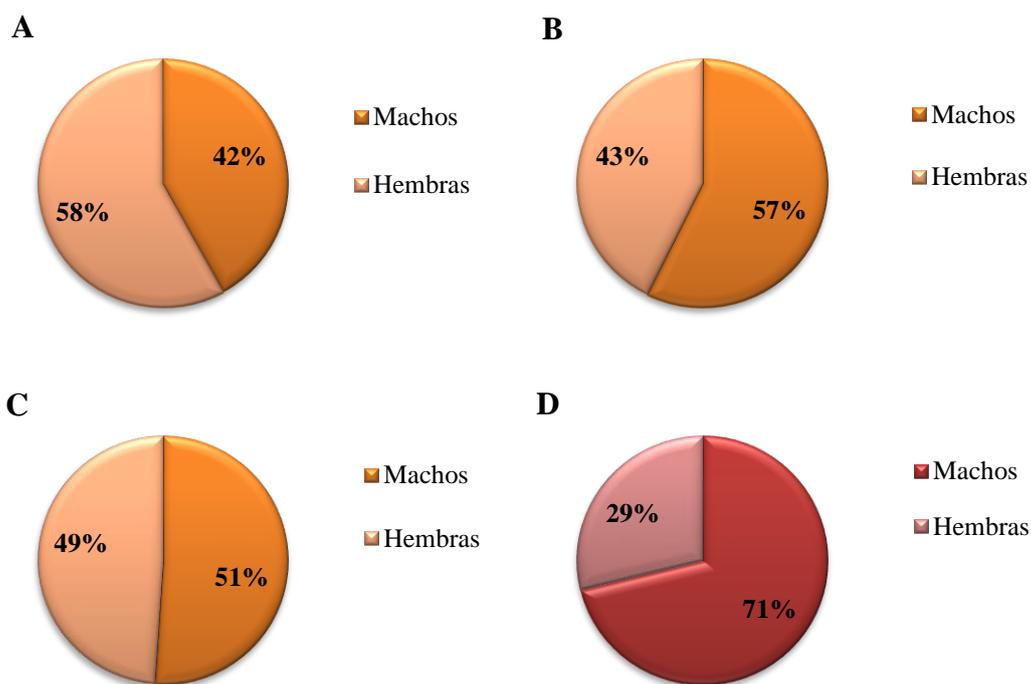


**Figura 19. Longitud según sexo y grupos experimentales.**  
Se muestra la longitud media  $\pm$  desviación estándar. A- Edad de 142 DPE. B- Edad de 176 DPE.



**Figura 20. Anchura según sexo y grupos experimentales.**  
Se muestra la anchura media  $\pm$  desviación estándar a 176 DPE.

Con el fin de evaluar el efecto de los tratamientos efectuados en la fase larvaria sobre la ratio de sexos poblacional, se estimó la proporción de machos y hembras en cada tanque así como de dos tanques controles cuyo cultivo larvario se efectuó a 20°C. En el caso de los controles a 20°C, las proporciones fueron coincidentes con un 71% de machos y 29% de hembras (n=212). Al comparar estas proporciones con las obtenidas en los tres grupos tratados con agua fría, se observó una reducción significativa del número de machos ( $\chi^2 P < 0,05$ ). El grupo S1-S2 fue el que presentó más hembras (58%; n=317) y se diferenció significativamente del grupo S2-S3 (43% hembras; n= 386). El grupo S4 presentó un 49%; n=327 de hembras y no se diferenció significativamente ni del grupo S1-S2 ni del S2-S3 (Fig. 21).



**Figura 21. Porcentaje de sexos según tratamiento.**

A- Grupo S1-S2, sometido a la temperatura de 16,5°C hasta el estadio S1-S2. B- Grupo S2-S3, sometido a la temperatura de 16,5°C hasta el estadio S2-S3. C- Grupo S4, sometido a la temperatura de 16,5°C hasta el estadio S4. D- Tratamiento control a 20°C durante todo el cultivo.

Respecto a la pigmentación, la tasa de malpigmentados fue muy elevada al día 65 DPE (~31%), aunque su incidencia se fue reduciendo progresivamente hasta el día 99 DPE para permanecer constante en torno al 6-7% (Fig. 22). No se observaron diferencias significativas para las frecuencias entre tratamientos. Al estudiar si el albinismo influía en el peso y la longitud media, se observó un menor crecimiento de los peces con malpigmentación ( $p < 0,05$ ) (Fig. 23). Al considerar si existía una asociación entre el sexo y la malpigmentación, se sexaron los animales malpigmentados muestreados a 176 DPE ( $n=28$ ), encontrando que la mayoría eran machos, además a la edad de 224 DPE, se hizo un segundo muestreo y sexaje de animales malpigmentados para determinar su relación con el sexo  $n=111$  con un 82%

de machos, no encontrando diferencias significativas en peso y longitud para la pigmentación cuando se consideraban ambas variables en el análisis (Fig. 24).

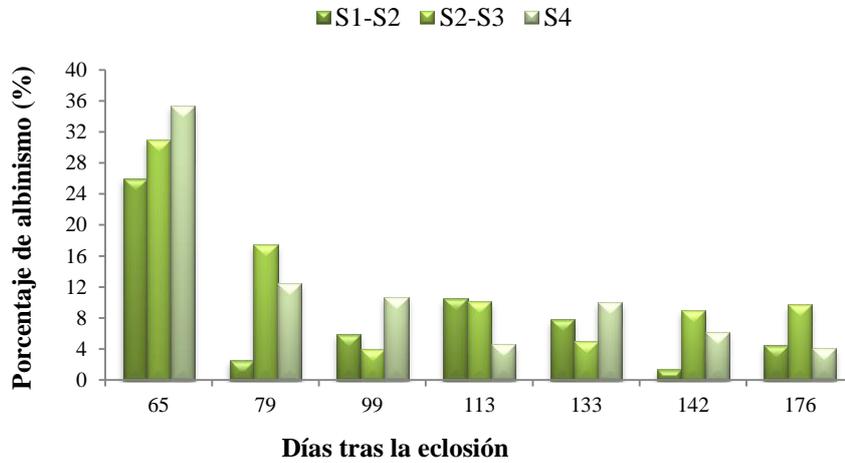


Figura 22. Porcentaje de malpigmentaciones según edad y tratamiento durante la fase de preengorde.

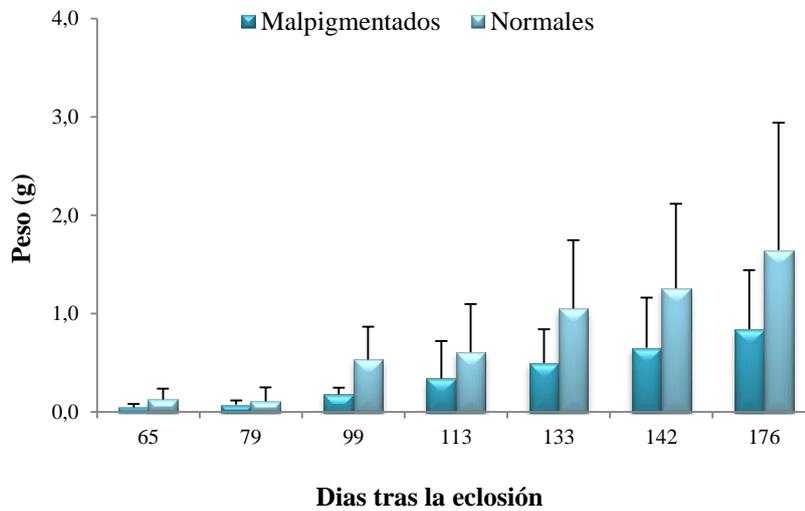
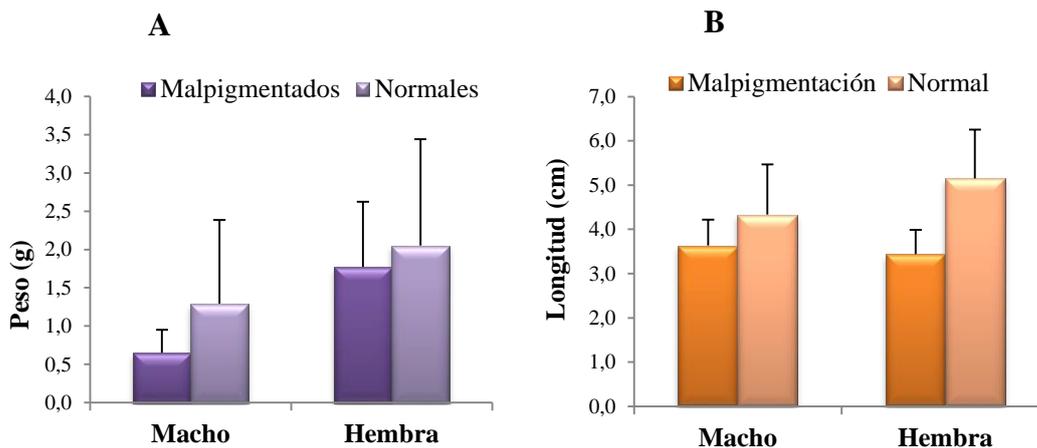
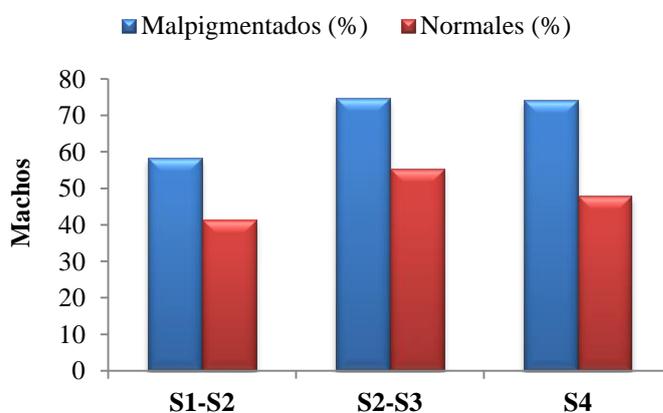


Figura 23. Peso medio  $\pm$  desviación estándar de individuos con malpigmentación y normales durante la fase de preengorde.



**Figura 24. Peso (A) y longitud (B) medias de individuos con malpigmentación y normales según sexo.**

Para confirmar este resultado respecto a la ratio de sexos en individuos con malpigmentación, se sexaron al azar nuevos individuos malpigmentados de cada tratamiento (total n=111) y se compararon con las ratios poblacionales de animales con pigmentación normal. Tal como se observa en la Fig. 25, las poblaciones con malpigmentación del experimento mostraron una mayor proporción de machos frente a las poblaciones con pigmentación normal independientemente del tratamiento térmico aplicado (S1-S2  $\chi^2 = 4,47$ ;  $p=0,03$ . S2-S3  $\chi^2 = 12,37$ ;  $p<0,001$ . S4  $\chi^2 = 17,04$ ;  $p<0,001$ ).



**Figura 25. Proporción de machos en poblaciones malpigmentadas y normales según tratamiento térmico.**

Para determinar si los tratamientos aplicados en fase larvaria tenían influencia sobre el crecimiento, se realizó un análisis estadístico para detectar diferencias en peso mediante ANOVA considerando tres factores fijos (pigmentación, sexo, tratamiento de temperatura) y la edad como covariable. Los resultados muestran que sólo se detectaron diferencias significativas para el sexo existiendo una pequeña interacción entre albinismo y sexo. En el caso de la longitud, los resultados fueron muy similares encontrado sólo diferencias significativas para el sexo ( $F=15,1$ ;  $p<0,001$ ) e interacción sexo-pigmentación ( $F=4,5$ ;  $p=0,011$ ). En el caso de la anchura, sólo se observaron diferencias significativas para el sexo ( $F=4,9$ ;  $p=0,008$ ), (Tabla VII).

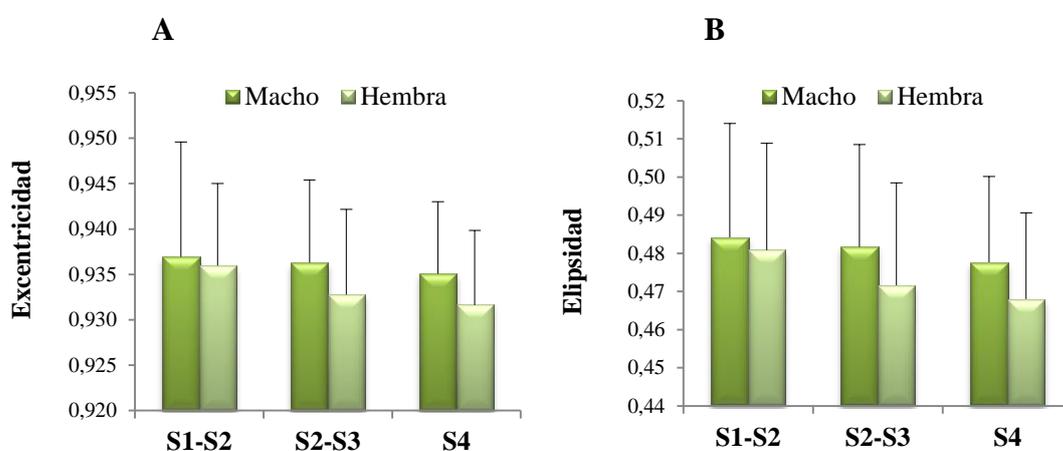
**Tabla VII. Análisis estadístico (ANOVA) para el peso. La pigmentación, sexo, tratamiento de temperatura se consideraron efectos fijos y la edad covariable**

Origen	Suma de cuadrados tipo III	gl	Media cuadrático a	F	Sig.
Modelo corregido	18,468 <sup>a</sup>	17	1,086	13,397	,000
Intersección	1,480	1	1,480	18,252	,000
Edad	1,225	1	1,225	15,112	,000
Pigmentación	,001	1	,001	,009	,922
Sexo	2,671	2	1,335	16,469	,000
Tratamiento	,281	2	,140	1,731	,178
Pigmentación * Sexo	,704	2	,352	4,338	,013
Pigmentación * Tratamiento	,050	2	,025	,310	,733
Sexo * Tratamiento	,323	4	,081	,997	,409
Pigmentación * Sexo *	,320	3	,107	1,314	,269
Tratamiento					
Error	57,168	705	,081		
Total	77,717	723			
Total corregida	75,635	722			

<sup>a</sup>. R cuadrado = ,244 (R cuadrado corregida = ,226)

Respecto a los parámetro de calidad morfológica, no se observaron diferencias significativas para la excentricidad entre tratamientos aunque sí para sexos ( $F=4,5$ ;  $p=0,011$ ) mientras que para elipsidad se encontraron diferencias por

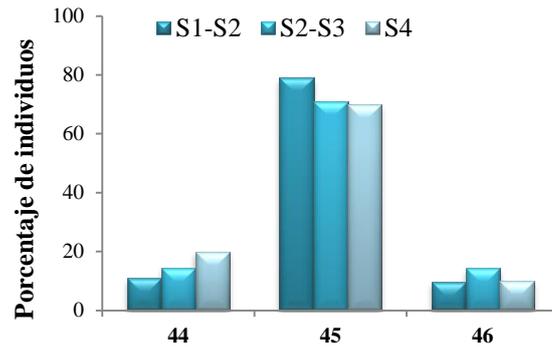
tratamiento ( $F=3,6$ ;  $p=0,029$ ) y sexo ( $F=4,9$ ;  $p=0,008$ ). Para ambos parámetros, las hembras fueron menos estilizadas que los machos. Mientras que para la elipsidad los S4 fueron menos estilizados que los S1-S2 (Fig. 26). Para comprobar si el tamaño de los peces tenía influencia en los datos obtenidos, se realizó una nueva ANOVA considerando el peso como covariable, no encontrando diferencias significativas ni en la excentricidad ni en la elipsidad con respecto al tratamiento ( $F= 2,606$ ;  $p= 0,75$ ) y al sexo ( $F= 0,821$ ;  $p= 0,441$ ).



**Figura 26. Excentricidad (A) y Elipsidad (B) según grupo experimental y sexo.**  
Se indica el valor medio  $\pm$  desviación estándar y sexo a día 176 DPE.

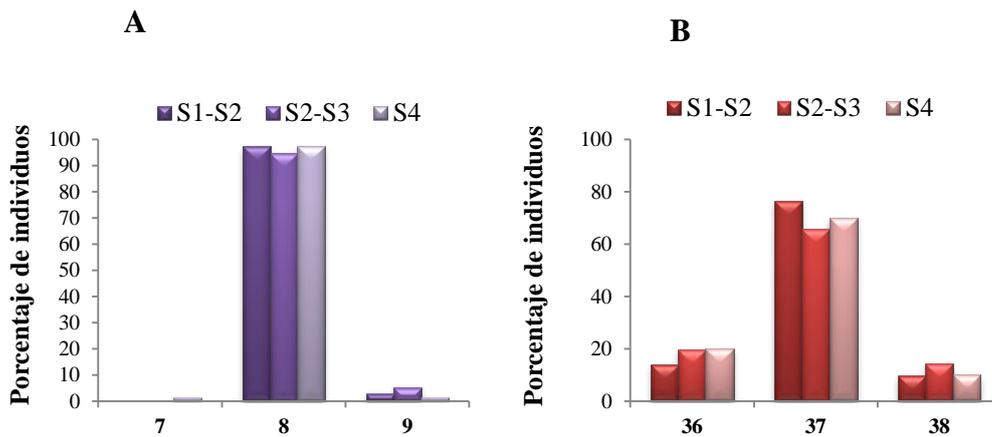
### 3.3 Efecto de los tratamientos de temperatura sobre las malformaciones

Para determinar el efecto de la temperatura sobre las malformaciones, en primer lugar se determinó el número total de vértebras de los lenguados según tratamiento. La moda estuvo en 45 vértebras totales, según se observa en la Fig. 27, no observando diferencias significativas entre tratamientos.



**Figura 27. Número de vértebras totales según grupo experimental.**  
La estimación se hizo al día 44 DPE y n=40.

El número de vértebras prehemales (Fig. 28A) y vértebras hemales (Fig. 28B) tampoco presentaron diferencias significativas entre los tratamientos de temperatura aplicados.



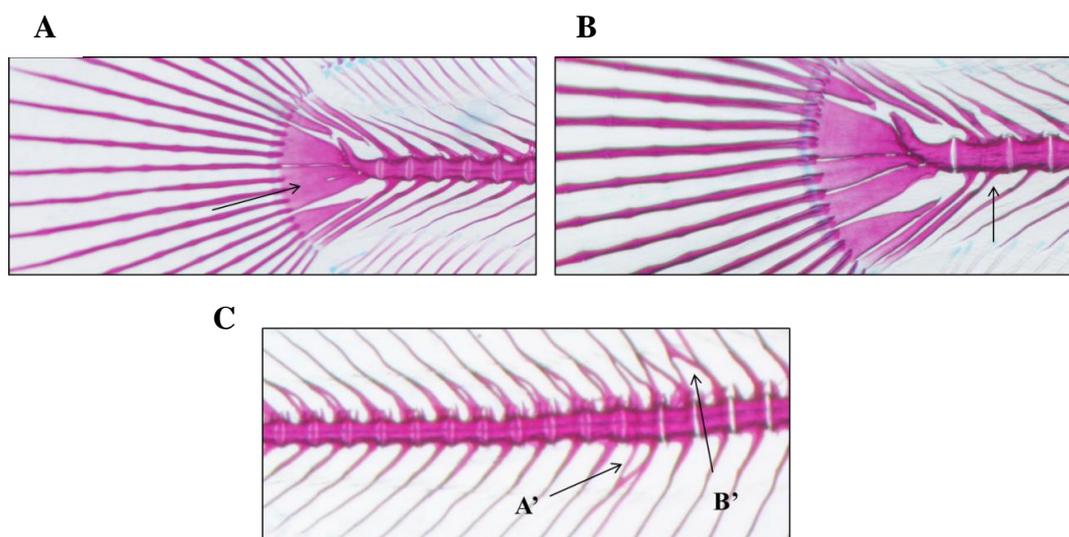
**Figura 28. Número de vértebras prehemales (A) y hemales (B) por individuo según grupo experimental.** Se indica el porcentaje de individuos según número de vértebras.

Al evaluar las malformaciones más comunes presentes en *S. senegalensis* del complejo de la aleta caudal (malformaciones de hipurales 1, 2, 3, 4 y 5; epural; parhipural; vértebra preural 1, 2 y 3; espina neural modificada; espina hemal modificada; radios de la aleta caudal) y columna vertebral (malformaciones presentes en las vértebras prehemales; hemales y componentes adyacentes) según Gavaia *et al.*, 2002, se pudo observar que el número de animales con una malformación osciló entre 30-35% para los tratamientos S2-S3, S4 y S1-S2, respectivamente aunque sin

diferencias significativas ( $\chi^2 = 2,04$ ;  $p > 0,05$ ). Los porcentajes totales de animales con al menos 1 malformación oscilaron entre el 42-47%, sin encontrar diferencias significativas entre tratamientos. Importante mencionar que no fue considerada como deformidad esquelética la fusión de hipurales 3-4, sino como parte del desarrollo normal del complejo de la aleta caudal que se produce en los juveniles de peces planos. Hubo diferencias significativas ( $\chi^2 = 6,97$ ;  $p < 0,03$ ) en cuanto a la fusión de vértebras preurales 1-2, entre el grupo S1-S2 con el S2-S3 (Tabla VIII). En la Fig. 29 se muestran algunos ejemplos de las malformaciones observadas.

**Tabla VIII. Incidencia de malformaciones según tratamiento.**

	S1-S2	S2-S3	S4
Número total de individuos	79	77	87
Individuos sin malformaciones (%)	54	53	57
Individuos con 1 malformación (%)	35	30	32
Individuos con 2 o más malformaciones (%)	10	17	10
Fusión vértebra preural 1-2 (%)	9 <sup>a</sup>	25 <sup>b</sup>	17 <sup>ab</sup>
Fusión hipural 1-2 (%)	9	5	3
Malformación arco neural (%)	8	9	14
Malformación arco hemal (%)	6	4	3
Otras malformaciones (%)	15	13	9



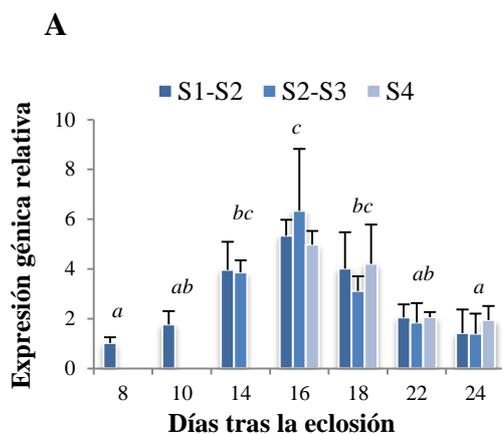
**Figura 29. Tipo de malformaciones observadas.**

A-La flecha muestra una fusión de hipural 1 e hipural 2 (imagen tomada a 3 aumentos). B-La flecha muestra la fusión de la vértebra preural 1 y 2 (imagen tomada a 4 aumentos). C-(A') la flecha muestra malformación del arco hemal, (B') la flecha indica malformación del arco neural (imagen tomada a 3 aumentos). Fotografías realizadas por B. Lorenzo, 2014.

### 3.4 Análisis de expresión génica

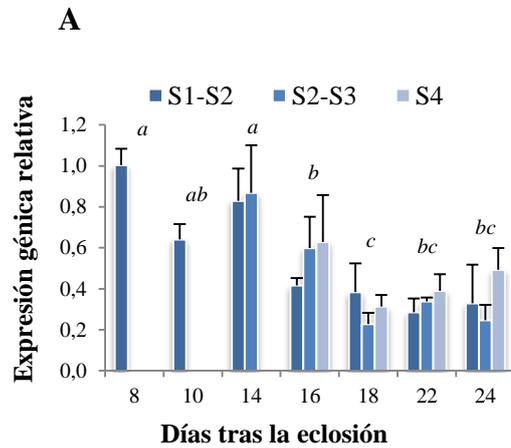
Para estudiar el efecto de la temperatura durante el cultivo larvario, se cuantificó la expresión de genes relacionados con el eje tiroideo, diferenciación sexual y metilación. Estos incluyeron la tiroglobulina (*tg*), receptor de estrógenos alfa (*era*), aromatas gonadal (*cyp19a1*) y ADN (citosina-5)-metiltransferasa 1 (*dnmt1*). Se cuantificaron los niveles de transcrito en los diferentes tratamientos de temperatura.

El análisis de expresión de *tg* en los tres tratamientos S1-S2, S2-S3 y S4 no presentó diferencias significativas pero sí se contempló para la edad ( $F=11,88$ ;  $p<0,001$ ). El pico de expresión se observó a los 16 DPE (5,5 veces más que a día 8 DPE) (Fig. 30).



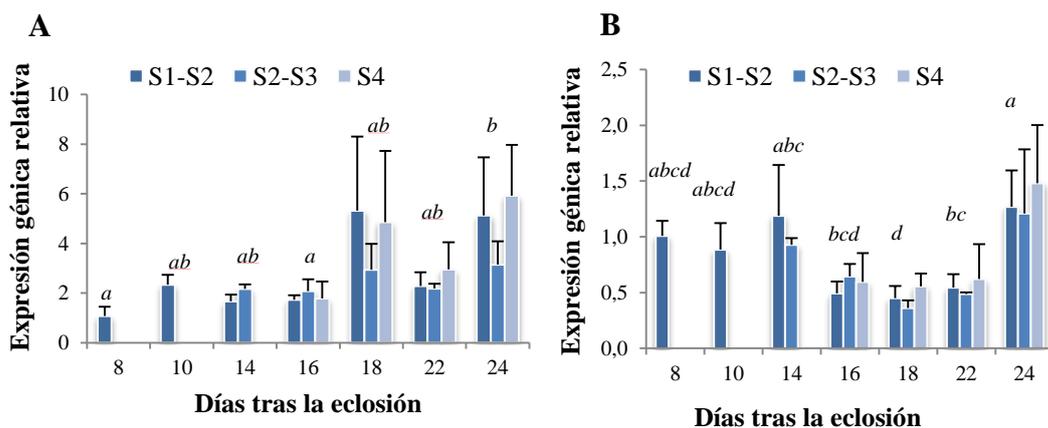
**Figura 30.** Expresión génica relativa de *tg* en los grupos S1-S2, S2-S3 y S4. Las letras indican diferencias significativas entre días.

El análisis de expresión de *dnmt1* en los tres tratamientos S1-S2, S2-S3 y S4 no presentó diferencias entre ellos aunque sí con la edad ( $F=19,09$ ;  $p<0,001$ ). Los niveles de ARNm se redujeron significativamente el día 16 DPE, alcanzando niveles mínimos a día 18 DPE (3,2 veces menos que a día 8 DPE; Fig. 31).



**Figura 31 - Expresión génica relativa de *dnmt1* en los grupos S1-S2, S2-S3 y S4.** Las letras indican diferencias significativas entre días.

Al analizar los tres tratamientos S1-S2, S2-S3 y S4 no se observaron diferencias en la expresión de *era* y *cyp19a1* aunque sí con la edad ( $F=8,28$ ;  $p<0,001$  y  $F=4,88$ ;  $p=0,002$ , respectivamente) (Fig. 32). Los niveles de transcrito de *era* se redujeron el día 18 (2,6 veces entre el día 14 y 18) y aumentaron significativamente el día 24 (2,8 veces entre el día 24 y 18). En el caso de *cyp19a1*, se encontraron diferencias entre los días 16 y 24 (2,5 veces más a día 24). El grupo S2-S3 mostró menores niveles de transcrito, aunque estas diferencias no fueron significativas.



**Figura 32. A- Expresión génica de *cyp19a1*. B- Expresión génica de *era* en los tratamientos S1-S2, S2-S3 y S4.** Las letras indican diferencias significativas entre días.

# DISCUSIÓN





#### 4. DISCUSIÓN

La modulación epigenética del crecimiento y la diferenciación sexual es una estrategia innovadora y complementaria a la estrategia clásica de selección para su aplicación en lenguado y se ha convertido en una opción para la mejora de producción dada la dificultad de implantación de un esquema de selección a corto plazo por la disfunción reproductiva de los animales criados en cautividad F1 (incapaces de producir puestas de forma espontánea fertilizadas). La impronta se beneficia de la plasticidad de los primeros estadios de desarrollo de los peces para influir en su diferenciación sexual o el desarrollo muscular y mejorar así los índices de crecimiento (Piferrer, 2013; Viñas *et al.*, 2012; Valente *et al.*, 2013). Además, los últimos estudios muestran que factores ambientales y nutricionales durante el cultivo son capaces de provocar efectos a largo plazo sobre el crecimiento la diferenciación sexual y salud (Piferrer, 2013; Choi y Friso, 2010). Estudios previos en lenguado han confirmado la plasticidad térmica de la miogénesis al incubar embriones o larvas a diferentes temperaturas con un efecto prolongado sobre la composición y desarrollo muscular del alevín (Campos *et al.*, 2013a; 2013b). Respecto, al efecto de la temperatura sobre la diferenciación sexual, un trabajo previo en lenguado mostró que un tratamiento largo (hasta 97 días tras la eclosión) mediante termociclos entre el día y la noche ( $\pm 3^{\circ}\text{C}$ ; 19-22°C) modificaba las ratios de sexos (Blanco-Vives *et al.*, 2011). Además, un estudio posterior identificó que agua fría (16°C) aplicada de forma continua hasta completar la metamorfosis (día 25 DPE) era útil para aumentar los porcentajes de hembras, observando un 54% hembras a 16°C frente 38% a 20°C (Manchado, comunicación personal). En el presente trabajo se ha podido determinar el período de termosensibilidad del lenguado utilizando como referencia los estadios metamórficos (S1, S2, S3 y S4). Las ratios de sexos observadas han demostrado que

los 3 tratamientos a 16,5°C aumentaban la proporción de hembras (43-58%) frente al 29% obtenido a 20°C. Además, el 49% de hembras obtenido para el S4 fue muy similar al observado previamente en un tratamiento semejante, no observando diferencias con respecto al tratamiento S1-S2. Los datos aquí mostrados demuestran por primera vez que la etapa premetamórfica desde el día 7 hasta el inicio de la metamorfosis (S1) va a ser crítica para influir a nivel epigenético en la diferenciación sexual del lenguado.

En acuicultura, la temperatura es un factor clave que va a ejercer una acción directa sobre el crecimiento. El lenguado es capaz de adaptarse rápidamente y tolerar cambios de temperatura entre 15-21°C, el rango de temperatura observado en su medio natural y dentro del cual ocurre la reproducción (Marzo-Junio) (Imsland *et al.*, 2003). En un estudio previo que realizaba el cultivo de larvas de lenguado a tres temperaturas (15, 18, 21°C) desde la eclosión observaron una importante reducción del crecimiento y muy baja supervivencia (sólo 10,2%) a las temperaturas más bajas. Además, mientras que las larvas completaban la metamorfosis a los 16 DPE a 21°C tras la eclosión, a 15°C lo hacían a los 35 DPE (Campos *et al.*, 2013b). Lo más interesante sería la detección de un crecimiento compensatorio cuando las larvas cultivadas inicialmente a agua más fría (15°C) eran cultivadas a 20°C de forma simultánea (Campos *et al.*, 2013b). Cuando los cambios de temperatura se han aplicado de forma más tardía en lenguado (16°C y 20°C a partir de 7 DPE), también se observan diferencias de crecimiento y del progreso de la metamorfosis, sin efecto en la supervivencia, siendo las diferencias en peso seco más acusadas a partir de la finalización de la metamorfosis (Manchado, comunicación personal) ya que la transformación metamórfica requiere una importante inversión de energía acumulada y la movilización de todas las reservas hacia la finalización de la misma (Fernández-

Díaz *et al.*, 2001; Yúfera *et al.*, 1999). En nuestro experimento, se pudo comprobar como sólo el grupo S4 presentó un menor crecimiento y un ligero retraso en el desarrollo de la metamorfosis frente a los grupos S1-S2 y S2-S3 (Fig. 16 y 17), lo que nos indica que sólo exposiciones prolongadas con agua fría (más de 9-10 días) van a provocar un retraso más acusado del crecimiento. Además, la supervivencias observadas (35,6-48,8%) fueron óptimas y no estuvieron asociadas a la duración de los tratamientos térmicos, lo que confirmaba los datos previos a los tratamientos térmicos en larvas a estas edades para su aplicación en la industria (Manchado, comunicación personal). Finalmente, al cultivar los tres grupos experimentales a la misma temperatura tras el destete y normalizar las cargas de los tanques, se observó un posible crecimiento compensatorio del grupo S4 hasta el día 142 con una mayor SGR durante todos los intervalos medidos, alcanzando un peso final similar a los grupos S1-S2 y S2-S3, lo que indicaría que el retraso observado durante metamorfosis tendría un bajo impacto sobre el crecimiento en la fase de preengorde tal como se describió anteriormente para esta especie (Campos *et al.*, 2013b).

Los pleuronectiformes se caracterizan por presentar diferencias en crecimiento entre sexos siendo las hembras más grandes y con un crecimiento más rápido. Diferencias significativas entre machos y hembras se han observado en pleuronectiformes de la familia Soleidae, Psettodidae, Pleuronectidae, Bothidae y Scophthalmidae (De Veen 1976; Deniel 1990; Druzhinin y Petrova 1980; Imsland *et al.* 1997). Por tanto, el cultivo y manejo de peces con mayor proporción de hembras va a ser por tanto de alta relevancia para reducir los tiempos de engorde y la dispersión por tallas (Piferrer, 2001; Sánchez *et al.*, 2010). En lenguado, un estudio en juveniles describió un mayor crecimiento de las hembras de *S. senegalensis* (entre 12,5-32% más de SGR) que los machos especialmente a densidades altas de cultivo

(Sánchez *et al.*, 2010). Posteriormente, un trabajo de cultivo a diferentes salinidades mostró que las hembras presentaban un 23,7% más de peso que los machos tras 56 días de cultivo sin influencia de la salinidad (Algarin *et al.*, 2013). En nuestro estudio, observamos entre un 44 y 39% mayor de peso en las hembras a los 142 y 176 DPE, lo que confirma el mayor crecimiento de las hembras. Este mayor peso también iba acompañado de una mayor longitud y anchura. Estudios en peces planos como la platija han sugerido que la energía dedicada al crecimiento somático y gonadal es igual entre sexos hasta una determinada talla en el que las hembras invierten más energía en el crecimiento (Rijnsdorp y Ibelings, 1989). Además, se ha sugerido que el mayor crecimiento de las hembras también se podría asociar a una mayor tasa de ingesta y longitud del intestino entre sexos (Lozán, 1992) así como una modulación de las relaciones de dominancia en las poblaciones (Sánchez *et al.*, 2010). En cualquier caso, nuestros datos confirman observaciones previas de un mayor crecimiento de las hembras según sus variables productivas, lo que permitiría la mejora de la producción de los rendimientos productivos en la acuicultura mediante el incremento de ratios de hembras en las poblaciones. No obstante, serían necesarios nuevos estudios más largos para evaluar las poblaciones de lenguados en tanques según ratios sexuales y sus consecuencias sobre comportamiento, jerarquización y sus rendimientos productivos.

Respecto a las características morfológicas, la excentricidad y elipsoidad son dos parámetros utilizados para determinar la calidad morfológica del lenguado, ya que los consumidores demandan que el producto final posea unas características estilizadas propias de la especie (Blonk *et al.*, 2010). En nuestro trabajo no se observaron diferencias significativas en la excentricidad ni elipsoidad para los tratamientos de temperatura y sexo. Aunque las hembras fueron menos estilizadas

que los machos, el mayor tamaño de las mismas sería responsable de las pequeñas diferencias de tamaño observadas. Un estudio previo en lenguado demostró que factores tales como el marcaje con PIT-Tags a nivel intraperitoneal o el cultivo a diferentes salinidades iban a provocar diferencias en los índices de elipsidad y excentricidad (Algarín *et al.*, 2013). Además, estos autores encontraron diferencias entre sexos siendo las hembras ligeramente más orondas, tal como se muestra en nuestro trabajo. Sin embargo, no se tuvo en consideración la diferencia de tamaño como covariable. Por tanto, las pequeñas diferencias en estos índices se podrían deber al mayor crecimiento de las hembras, tal como se observó en nuestro trabajo.

Otro factor morfológico de gran importancia en peces planos por su impacto en la comercialización del producto son las malpigmentaciones (Villalta *et al.*, 2005; Soares *et al.*, 2001). El proceso de pigmentación en *S. senegalensis* se inicia en premetamorfosis y se considera irreversible tras la finalización de la metamorfosis existiendo una ventana de sensibilidad más pronunciada durante premetamorfosis (Lund *et al.*, 2008; Soares *et al.*, 2001). Las tasas de malpigmentaciones varían según las condiciones de cultivo. Estudios previos mostraron hasta un 11% de malpigmentación a los 70 días de cultivo (Soares *et al.*, 2001) pero que podían alcanzar hasta el 70% (Imsland *et al.*, 2003). En nuestro caso, las tasas de malpigmentaciones se redujeron progresivamente desde un ~31% al día 65 DPE hasta el 6-7% a partir del día 99 DPE sin encontrar diferencias entre los tratamientos de temperatura aplicados (Fig. 23). Estos datos nos indican que existe una ventana entre la finalización de la metamorfosis y los 90-100 DPE en la que el lenguado es capaz de completar y finalizar la pigmentación. La alteración de la pigmentación en peces planos se ha relacionado principalmente con factores nutricionales, endocrinológicos, ambientales y genéticos. Así, la vitamina A, los ácidos grasos y las

hormonas tiroideas se han relacionado con alteraciones de pigmentación en peces planos (Villalta *et al.*, 2005; Hamre *et al.*, 2007; Cerda y Manchado, 2013). Además, la temperatura es capaz de modificar la tasa de malpigmentaciones en los peces planos (*Pseudopleuronectes herzensteini* y *P. olivaceus*) (Aritaki y Seikai, 2004). En el caso del lenguado senegalés, los niveles altos de ácido araquidónico y unos niveles bajos de hormonas tiroideas se han asociado a malpigmentación en los juveniles (Villalta *et al.*, 2005; Manchado *et al.*, 2008a; Cerda y Manchado, 2013). En el lenguado común, también se ha observado una asociación entre los niveles de araquidónico y prostaglandinas (Lund *et al.*, 2008). En nuestro caso, no observamos diferencias significativas entre los tratamientos de temperatura y la causa más probable es que se deba a factores nutricionales debido a un pequeño desajuste entre la alimentación y una renovación de agua mayor de lo normal aplicada en los tanques para mantener constante de la temperatura.

Lo más interesante fue el menor crecimiento observado en los animales malpigmentados, aunque estas diferencias se explicaban principalmente por una mayor proporción de machos de acuerdo con las ratios de sexos observadas en sus tanques de procedencia. Estudios previos en peces planos sobre la pigmentación y su asociación al crecimiento muestran resultados contradictorios. En el lenguado japonés y lenguado común encontraron un menor crecimiento de los juveniles albinos (Shikano *et al.*, 2007; Lund *et al.*, 2007). En el caso de lenguado común, el albinismo (entendido como más de un 95% de malpigmentación) iba acompañado con un alto porcentaje de animales con un fallo en la migración del ojo. En cambio, otros autores no encontraron diferencias en peso, longitud o tasas específicas de crecimiento entre animales malpigmentados y normales en rodaballo y fletán (Imsland *et al.*, 2006). En algunos casos como el rodaballo además se ha descrito un

crecimiento más rápido de los malpigmentados que los normales (Heap y Thorpe (1987). Nuestros datos indican que en lenguado la causa subyacente a la malpigmentación podría estar también influenciando la diferenciación sexual favoreciendo la producción de machos pero sin malformación en la migración del ojo. Estos datos demuestran la importancia de monitorizar variables tan importantes como el sexo en estas edades y que podrían enmascarar los efectos específicos a la pigmentación.

El número de vértebras de la columna de *S. senegalensis* en este experimento tuvo una moda de 45 vertebras totales que se distribuían en 8 vértebras abdominales o prehemales equipadas dorsalmente con un arco y espina neural y ventralmente con un par de parapófisis a partir de la quinta vértebra hasta la octava y 37 vértebras caudales o hemales (incluyendo el urostilo) compuestas dorsalmente por un arco y espina neural y ventralmente por un arco y espina hemal siendo la espina neural de las vértebras preurales 1 y 2 y la espina hemal de la vértebra preural 1 más alargada y modificada actuando como soporte de apoyo de los radios de la aleta caudal. El recuento de vértebras coincide con lo descrito previamente para lenguado (Gavaia *et al.*, 2002; Fernández *et al.*, 2009) sin que existan diferencias significativas entre tratamientos. La incidencia de malformaciones observada se situó entre el 42-47%. Resultados similares se encontraron en el trabajo de Gavaia y cols (2002) con un 41% de malformaciones aunque en algunos casos se han descrito hasta del 80% (Engrola *et al.*, 2009). La incidencia de malformaciones en peces criados en cautividad normalmente es superior a la observada en individuos capturados del medio natural de la misma especie (revisado en Gavaia *et al.*, 2002). Factores ambientales, de manejo y nutricionales van a jugar un papel clave en esta diferencia. Así, un exceso de ácido araquidónico provocaría un incremento de las

malformaciones craneales (Bogolino *et al.*, 2013). De igual forma, los niveles de vitamina A van a modificar la esqueletogénesis en lenguado aumentando la incidencia de malformaciones especialmente en la aleta caudal así como una vértebra hemal supernumeraria o como fusiones/compresiones vertebrales a las dosis más elevadas (Fernández *et al.*, 2009). También, la temperatura de cultivo va a jugar un papel clave observando que las tasas de incidencia de malformaciones se incrementaban al 59,6% cuando los embriones de lenguado eran incubados a 15°C y hasta el 80,4% cuando se hacía a 21°C (Dionisio *et al.*, 2012). Además, la incubación a 15°C incrementa drásticamente las malformaciones en las vértebras preurales (55%) frente una mayor incidencia (30%) en las caudales a 18°C. En nuestro trabajo también se observó una mayor proporción individuos con fusión de vértebras preurales entre el grupo S2-S3 y S1-S2, lo que sugiere que las diferencias observadas se podrían explicar con la duración de los tratamientos de agua fría aplicados.

Las THs juegan un papel clave en la metamorfosis de lenguado (Manchado *et al.*, 2008b). Durante el clímax de la metamorfosis existe un pico de T4 que facilitaría el progreso de la metamorfosis. La aplicación de compuestos bociógenos como la tiourea bloquearía el progreso de la misma y la migración del ojo. El gen *tg* es un componente esencial del sistema H-H-T al regulado negativamente a nivel transcripcional por sus ligandos (Manchado *et al.*, 2008a; 2009). Además, los niveles de ARNm de *tg* se han considerado como un biomarcador de la síntesis de THs adecuado para monitorizar su producción (Manchado *et al.*, 2008b). Recientemente, se ha demostrado que en pez cebra, las THs van a jugar un papel clave en la aclimatación térmica del metabolismo así como una acción específica según la temperatura. La aclimatación al frío produjo un incremento de la tasa metabólica y

de la actividad natatoria de una forma mediada por THs (Little *et al.*, 2013). Este papel sobre el metabolismo energético es clave en el lenguado ya que requiere un adecuado acúmulo de reservas en los estadios premetamórficos para culminar la metamorfosis con éxito (Yufera *et al.*, 1999). No hubo diferencias en los patrones de expresión para la *tg* en los tratamientos S1-S2, S2-S3 y S4 en los que se aplicó frío durante el periodo de premetamorfosis, lo que confirmaría nuestra hipótesis de una activación coordinada del eje H-H-T para garantizar una actividad metabólica adecuada para la finalización con éxito de esta etapa clave en el desarrollo del lenguado.

La regulación epigenética de la diferenciación sexual y miogénesis por metilación se ha descrito en varias especies de peces (Campos *et al.*, 2013c; Piferrer, 2013; Chen *et al.*, 2014). El gen *dnmt1* va a codificar una metilasa que está implicada en el mantenimiento de los patrones de metilación y posee un papel directo sobre la metilación de histonas. Estudios en lenguado han demostrado que *dnmt1* presenta mayores niveles de ARNm cuando las larvas recién eclosionadas se cultivan a 15°C hasta el estadio metamórfico S2. Este cambio de expresión estuvo asociado a un cambio en el patrón de metilación de *myog* implicado en la diferenciación muscular. No se observaron diferencias entre los tratamientos S1-S2, S2-S3, y S4. Estos datos indicarían que el periodo antes del inicio de la metamorfosis y los primeros estadios metamórficos (S1-S2) sería una ventana clave para modular la expresión de las metilasas e inducir cambios en los patrones de metilación. Respecto a los genes de diferenciación sexual, sólo encontramos un aumento significativo de expresión para *era* en los tratamientos de agua fría aunque para *cyp19a1* también se encontraron niveles más altos en agua fría sólo para el día 9. La diferenciación del ovario requiere de un incremento sostenido de una alta síntesis de estrógenos (Guiguen *et al.*, 2010).

Así, la expresión de la aromatasa gonadal y los receptores de estrógenos incluyendo el tipo alfa van a estar regulados positivamente por estrógenos y van a ser claves en la formación del ovario (Yamaguchi *et al.*, 2007; Strobl-Mazzulla *et al.*, 2008; Verneti *et al.*, 2013). Se cree que la temperatura modula la diferenciación sexual mediante una alteración de la biosíntesis de estrógenos y sus cascadas regulatorias, de tal forma que una inhibición de su síntesis resultaría en la masculinización de hembras genéticas. De esta forma, los tratamientos con compuestos antiestrógenos o con altas temperaturas en el lenguado senegalés, lenguado japonés, tilapia o fletán producirían poblaciones enriquecidas en machos ambientales y una reducción de la expresión de *cyp19a1* en gónadas (Kitano *et al.*, 1999, 2000; D'Cotta *et al.*, 2001; Van Nes y Andersen, 2006; Viñas *et al.*, 2012). Sin embargo, las diferencias de expresión en lenguado japonés no se observaban hasta el período de diferenciación sexual (50 DPE), al expresarse *cyp19a1* en el ovario en desarrollo (Kitano *et al.*, 1999). Dado que nuestros estudios se realizaron antes del período de diferenciación gonadal en lenguado, que ocurre después de metamorfosis, se requeriría de evaluaciones a edades más avanzadas. Sin embargo, el patrón de expresión de *cyp19a1* en los grupos experimentales (menos niveles de ARNm en S2-S3 aunque no significativos y su asociación a un menor número de hembras) así como la mayor expresión de *era* en agua fría durante premetamorfosis sugiere que nuestros tratamientos de temperatura aplicados estarían modulando la expresión de estos genes para inducir una mayor proporción de hembra en las poblaciones. Además, de forma interesante, la tasa de hembras obtenida en fletán debido a los tratamientos térmicos nunca excedió del 50%, debido que el sexo homogamético (XX) es termolábil (Van Nes y Andersen, 2006), lo cual es muy similar a lo observado en el lenguado senegalés también con un sistema XX-XY.

# CONCLUSIONES





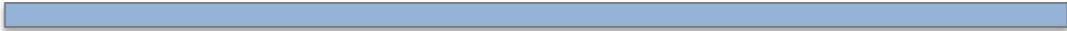
## 5. CONCLUSIONES

1. Los tres tratamientos a 16,5°C efectuados fueron eficaces para aumentar la proporción de hembras en las poblaciones cultivadas de lenguado con respecto a las de 20°C. Los porcentajes de hembras fueron similares entre los grupos S1-S2 (58%) y S4 (49%) lo que indica que el período de premetamorfosis es clave en inducir cambios prolongados en la diferenciación sexual del lenguado.
2. Los tratamientos prolongados (S4) a 16,5°C retrasaron el crecimiento larvario y metamorfosis. Sin embargo, se observó un crecimiento compensatorio hasta el día 142 DPE, sin que existiesen diferencias de peso al final del experimento.
3. Las hembras presentaron mayor crecimiento que los machos para todos los parámetros biométricos con independencia de los tratamientos térmicos aplicados. En peso, al final del experimento las hembras presentaron un 61% más de peso. Estas diferencias en tamaño explicarán las diferencias en los índices de morfología observados.
4. Los individuos malpigmentados presentaron un mayor porcentaje de machos con respecto a sus poblaciones control. Este sesgo de machos explicaría el menor crecimiento de los animales malpigmentados.
5. El incremento de expresión coordinado del gen importante del eje tiroideo *tg* indica una activación del eje H-H-T a 16,5°C como un mecanismo regulador de metabolismo energético y del suministro de THs necesarias para la finalización exitosa de la metamorfosis.
6. El incremento de *dntm* en fase premetamórfica a 16,5°C sugiere que esta etapa es crítica para inducir cambios de los perfiles de metilación en la larva. Además, el incremento de expresión en esta fase de *era* y secundariamente de *cyp19a1* sugiere

que a esa temperatura se podría estar modificando el metabolismo de estrógenos y que estarían asociados en la diferenciación de hembras.

7. El tratamiento del grupo S1-S2 podría asignarse como el más recomendable para un empleo práctico en empresas de producción, ya que ocupa el menor tiempo de enfriamiento de agua, disminuyendo los costes que ello conlleva, aumentando el porcentaje de hembras sin provocar retraso de crecimiento ni desarrollo metamórfico así como diferencias significativas en malpigmentaciones y malformaciones respecto a los otros tratamientos.

# REFERENCIAS





## 6. REFERENCIAS

Alami-Durante, H., Olive, N. y Rouel, M. 2007. Early thermal history significantly affects the seasonal hyperplastic process occurring in the myotomal white muscle of *Dicentrarchus labrax* juveniles. *Cell and Tissue Research* 327, 553-570.

Algarín, M., Armesto, P., Aparicio, M., Berbel, C., Crespo, A., Ponce, M., M. Manchado. 2013. Efecto de la salinidad y el sexo sobre los parámetros productivos y de calidad en juveniles de lenguado senegalés. *XIV Congreso Nacional de Acuicultura*, 23-26 Septiembre, Gijón.

APROMAR, 2009. La Acuicultura Marina de Peces en España.

APROMAR y ESACUA. 2013. La acuicultura en España, 2013. [http://www.fundacionoesa.es/images/stories/publicaciones/libros/acuicultura\\_en\\_esp\\_2013.pdf](http://www.fundacionoesa.es/images/stories/publicaciones/libros/acuicultura_en_esp_2013.pdf).

Arias, A. y Drake P. 1990. Estados juveniles de la ictiofauna en los caños de las salinas de la Bahía de Cádiz. Instituto de ciencias Marinas de Andalucía. CSIC.

Aritaki, M. y Seikai, T. 2004. Temperature effects on early development and occurrence of metamorphosis-related morphological abnormalities in hatchery-reared brown sole *Pseudopleuronectes herzensteini*. *Aquaculture* 240, 517-530.

Bauchot, M. L. y Pras, A. 1980. *Guide des poissons marins d'Europe*. En: Delachaux y Niestle (Eds.). France, pp 427.

Bengtsson, Å., Bengtsson, B.E. y Lithner, G. 1998. Vertebral defects in fourhorn sculpin, *Myoxocephalus quadricornis* L., exposed to heavy metal pollution in the Gulf of Bothnia. *Journal of Fish Biology* 33, 517-529.

Ben-Tuvia, A. 1990. A taxonomic reappraisal of the Atlanto-Mediterranean soles *Solea solea*, *S. senegalensis* and *S. lascaris*. *Journal of Fish Biology* 36, 947-960.

Blanco-Vives, B., Vera, L.M., Ramos, J., Bayarri, M.J., Mañanos, E. y Sanchez-Vazquez, F.J. 2011. Exposure of larvae to daily thermocycles affects gonad development, sex ratio, and sexual steroids in *Solea senegalensis*, kaup. *Journal of Experimental Zoology Part A: Ecological Genetics and Physiology* 315 (3), 162-169.

Blonk, R.J.W., Komen, J., Tenghe, A., Kamstra, A. y van Arendonk. J.A.M. 2010. Heritability of shape in common sole, *Solea solea*, estimated from image analysis data. *Aquaculture* 307, 6-11.

Boglino, A., Wishkerman, A., Darias, M.J., Andree, K.B., de la Iglesia, P., Estévez, A. y Gisbert, E. 2013. High dietary arachidonic acid levels affect the process of eye migration and head shape in pseudoalbino Senegalese sole *Solea senegalensis* early juveniles. *Journal of Fish Biology* 83 (5), 1302-20.

Cahu, C.L., Zambonino-Infante, J.L. y Takeuchi, T. 2003. Nutritional components affecting skeletal development in fish larvae. *Aquaculture* 227, 245-258.

Campos, C., Valente, L.M., Conceição, L.E., Engrola, S., Sousa, V., Rocha, E. y Fernandes, J.M. 2013a. Incubation temperature induces changes in muscle cellularity and gene expression in Senegalese sole (*Solea senegalensis*). *Gene* 516 (2), 209-217.

Campos, C., Castanheira, M.F., Engrola, S., Valente, L.M., Fernandes, J.M. y Conceicao, L.E. 2013b. Rearing temperature affects Senegalese sole *Solea senegalensis*) larvae protein metabolic capacity. *Fish Physiology and Biochemistry* 39, 1485-96.

Campos, C., Valente, L., Conceição, L., Engrola, S. y Fernandes, J. 2013c. Temperature affects methylation of the myogenin putative promoter, its expression and muscle cellularity in Senegalese sole larvae. *Epigenetics*, 8, 389-397.

Cañavate, J. P. 2005. Opciones del lenguado senegalés *Solea senegalensis* Kaup, 1858 para diversificar la acuicultura marina. *Boletín del Instituto Español de Oceanografía* 21, 147-154.

Cañavate, J.P., Zerolo, R. y Fernández- Díaz, C. 2007. Feeding and development of Senegal sole (*Solea senegalensis*) larvae reared in different photoperiods. *Aquaculture* 258, 368-377.

Cerda, J. y Manchado, M. 2013. Advances in genomics for flatfish aquaculture. *Genes and Nutrition* 8, 5-17.

Chen, S., Zhang, G., Shao, C., Huang, Q., Liu, G., Zhang, P., Song, W., An, N., Chalopin, D., Volff, J.N., Hong, Y., Li, Q., Sha, Z., Zhou, H., Xie, M., Yu, Q., Liu, Y., Xiang, H., Wang, N., Wu, K., Yang, C., Zhou, Q., Liao, X., Yang, L., Hu, Q., Zhang, J., Meng, L., Jin, L., Tian, Y., Lian, J., Yang, J., Miao, G., Liu, S., Liang, Z., Yan, F., Li, Y., Sun, B., Zhang, H., Zhang, J., Zhu, Y., Du, M., Zhao, Y., Schartl, M., Tang, Q. y Wang, J. 2014. Whole-genome sequence of a flatfish provides insights into ZW sex chromosome evolution and adaptation to a benthic lifestyle. *Nature Genetics* 46, 253-260.

Choi, S.W. y Friso, S. 2010. Epigenetics: A New Bridge between Nutrition and Health. *Advances in Nutrition* 1 (1), 8-16.

D'Cotta, H., Fostier, A., Guiguen, Y., Govoroun, M. y Baroiller, J.F. 2001. Aromatase plays a key role during normal and temperature-induced sex differentiation of tilapia *Oreochromis niloticus*. *Molecular Reproduction and Deveopment* 59, 265-276.

Dedi, J., Takeuchi, T., Hosoya, K., Watanabe, T. y Seikai, T. 1998. Effect of vitamin A levels in Artemia nauplio on the caudal skeleton formation of Japanese flounder *Paralichthys olivaceus*. *Fisheries Science* 64, 344-345.

De Groef, B., Van der Geyten, S., Darras, V.M. y Kuhn, E.R. 2006. Role of corticotropin-releasing hormone as a thyrotropin-releasing factor in non-mammalian vertebrates. *General and Comparative Endocrinology* 146, 62-68.

De Veen, J.F. 1976. On changes in some biological parameters in the North Sea sole (*Solea solea* L.). *Journal du Conseil, Conseil International pour l'Exploration de la Mer* 3, 60-90.

Deniel, C. 1990. Comparative study of growth of flatfishes on the west coast of Brittany. *Journal of Fish Biology* 37, 149-166.

Dinis, M.T., Ribero, L., Soares, F. y Sarasquete, C. 1999. A review on the cultivation potential of *Solea senegalensis* in Spain and in Portugal. *Aquaculture* 176, 27-38.

Dionisio G., Campos C., Valente, L.M.P., Conceição L.E.C., Cancela M. L. y Gavaia, P. J. 2012. Effect of egg incubation temperature on the occurrence of skeletal deformities in *Solea senegalensis*. *Journal of Applied Ichthyology* 28, 471-476.

Druzhinin, A.D. y Petrova, Y.G. 1980. Some data on the ecology and growth of *Psettodes erumei* (Family Psettodidae Order Pleuronectiformes) of the Gulf of Aden. *Journal of Ichthyology* 20, 143-147.

Dumont, J.E., Maenhaut, C., Christophe, D., Vassart, G. y Roger, P.P. 2005. The phylogeny, ontogeny, anatomy and regulation of the iodine metabolizing thyroid. En: Degroot, L.J., Hennemann, G., other experts (Eds.), *The Thyroid and its Diseases*. <http://www.thyroidmanager.org>.

IE Einarsdóttir; N Silva; DM Power; H Smáradóttir; BT Björnsson. 2006. Thyroid and pituitary gland development from hatching through metamorphosis of a teleost flatfish, the Atlantic halibut. *Anatomy and Embryology* 211, 47-60.

Engrola, S., Figueira, L., Conceição, L.E.C., Gavaia, P.J., Ribeiro, L. y Dinis, M.T. 2009. Co-feeding in Senegalese sole larvae with inert diet from mouth opening promotes growth at weaning. *Aquaculture* 288, 264-227.

Estevez, A. y Kanazawa, A. 1995. Effect of (n-3) PUFA and vitamin A Artemia enrichment on pigmentation success of turbot, *Scophthalmus maximus* (L) *Aquaculture Nutrition* 1, 159-168.

Evans, B.I. y Fernald, R.D. 1993. Retinal transformation at metamorphosis in the winter flounder (*Pseudopleuronectes americanus*). *Visual Neuroscience* 10, 1055-1064.

Evans, B.I., Harosi, F.I. y Fernald, R.D. 1993. Photoreceptor spectral absorbance in larval and adult winter flounder (*Pseudopleuronectes americanus*). *Visual Neuroscience* 10, 1065-1071.

FAO, 2014. FAO Global Aquaculture Production Volume and Value Statistics Database. <ftp://ftp.fao.org/FI/STAT/Overviews/AquacultureStatistics2012.pdf>.

Faustino, M. y Power, D.M. 1999. Development of the pectoral, pelvic, dorsal and anal fins in cultured sea bream. *Journal of Fish Biology* 54, 1-17.

Fernández, I., Pimentel, M.S., Ortiz Delgado, J.B., Hontoria, F., Sarasquete, C., Estévez, A., Zambonino Infante, J.L. y Gisbert, E. 2009. Effect of dietary vitamin A on Senegalese sole (*Solea senegalensis*) skeletogenesis and larval quality. *Aquaculture* 295, 250-265.

Fernández-Díaz, C., Yúfera, M., Cañavate, J.P., Moyano F.J., Alarcón, F.J. y Díaz, M. 2001. Growth and physiological changes during metamorphosis of Senegal sole reared in the laboratory. *Journal of Fish Biology* 58, 1086-1097.

Filby, A.L., Thorpe, K.L., Maack, G., Tyler, C.R. 2007. Gene expression profiles revealing the mechanisms of anti-androgen- and estrogen-induced feminization in fish. *Aquatic Toxicology* 81 (2), 219-231.

FishBase. World Wide Web electronic publication. [www.fishbase.org](http://www.fishbase.org), version (02/2014).

Galloway, T.F., Kjorsvik, E. y Kryvi, H. 1999. Muscle growth in yolk-sac larvae of the Atlantic halibut as influenced by temperature in the egg and yolk-sac stage. *Journal of Fish Biology* 55, 26-43.

Gavaia, P.J., Sarasquete, M.C. y Cancela, M.L. 2000. Detection of mineralized structures in very early stages of development of marine teleostei using a modified Alcian blue-Alizarin red double staining technique for bone and cartilage. *Biotechic and Histochemistry* 75, 79-84.

Gavaia P.J., Dinis M.T. y Cancela M.L. 2002. Osteological development and abnormalities of the vertebral column and caudal skeleton in larval and juvenile stages of hatchery-reared Senegal sole (*Solea senegalensis*). *Aquaculture* 211, 305-323.

Guiguen, Y., Fostier, A., Piferrer, F. y Chang, C.F. 2010. Ovarian aromatase and estrogens: a pivotal role for gonadal sex differentiation and sex change in fish. *General and Comparative Endocrinology* 165, 352-366.

Hamre, k., Holen, E. y Moren, M. 2007. Pigmentation and eye migration in Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus* L.) larvae: new findings and hypotheses. *Aquaculture Nutrition* 13, 65-80.

Heap, S.P. y J.P. Thorpe. 1987. A preliminary study of comparative growth rates in 0-group malpigmented and normally pigmented turbot, *Scophthalmus maximum* (L.), and turbot-brill hybrids, *S. maximum* x *S. rhombus* (L.), at two temperatures. *Aquaculture* 60, 251-264.

Hilomen-Garcia, G.V. 1997. Morphological abnormalities in hatchery-bred milkfish (*Chanos chanos*, Forsskal) fry and juveniles. *Aquaculture* 152, 55-166.

Howell, B.R. 1997. Are-appraisal of the potential of the sole, *Solea solea* (L.), for commercial cultivation. *Aquaculture* 155, 355-365.

ICTIOTERM. 2013. Base de datos terminológicos y de identificación de especies pesqueras de las costas de Andalucía. En: Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Madrid, España.

Imslund, A.K., Folkvord, A., Grung, G.L., Stefansson, S.O., Taranger, G.L. 1997. Sexual dimorphism in growth and maturation of turbot, *Scophthalmus maximus* (Rafinesque 1810). *Aquacult. Research*. 28, 101-114.

Imslund, A.K., Foss, A., Conceição, L.E.C., Dinis, M.T., Delbare, D., Schram, E., Kamstra, A., Rema, P. y White, P. 2003. A review of the culture potential of *Solea solea* and *S. senegalensis*. *Reviews in Fish Biology Fisheries* 13, 379-407.

Imslund, A.K., Wergeland, T., Jonassen, T.M. y Stefansson, S.O. 2006. Does malpigmentation improve growth in juvenile turbot (*Scophthalmus maximus* Rafinesque) and halibut (*Hippoglossus hippoglossus* L.)? *Aquaculture Research* 37, 306-312.

Infante, C., Manchado, M., Asensio, E. y Cañavate, J.P. 2007. Molecular characterization, gene expression and dependence on thyroid hormones of two type I keratin genes (*sseKer1* and *sseKer2*) in the flatfish Senegalese sole (*Solea senegalensis* Kaup). *BMC Developmental Biology* 7, 118.

Infante, C., Asensio, E., Cañavate, J.P. y Manchado, M. 2008a. Molecular characterization and expression analysis of five different elongation factor 1 alpha genes in the flatfish Senegalese sole (*Solea senegalensis* Kaup): differential gene

expression and thyroid hormones dependence during metamorphosis. *BMC Molecular Biology* 9, 19.

Infante, C., Matsuoka, M.P., Asensio, E., Cañavate, J.P., Reith, M., Manchado, M. 2008b. Selection of housekeeping genes for gene expression studies in larvae from flatfish using real-time PCR. *BMC Molecular Biology* 9, 28.

Infante, C., Ponce, M. y Manchado, M. 2011. Duplication of calsequestrin genes in teleosts: molecular characterization in the Senegalese sole (*Solea senegalensis*). *Comparative Biochemistry and Physiology* 158, 304-314.

Izquierdo, M.S., Socorro, J., Arantzamendi, L. y Hernández-Cruz, C.M. 2000. Recent advances in lipid nutrition in fish larvae. *Fish Physiology and Biochemistry* 22, 97-107.

Johnston, I.A. 2006. Environment and plasticity of myogenesis in teleost fish. *Journal of Experimental Biology* 209, 2249-2264.

Johnston, I.A., McLay, H.A., Abercromby, M. y Robins, D. 2000. Early thermal experience has different effects on growth and muscle fibre recruitment in spring- and autumn-running Atlantic salmon populations. *Journal of Experimental Biology* 203(Pt 17), 2553-2564.

Kitajima, C., Watanabe, T., Tsukashima, Y. y Fujita, S. 1994. Lordotic deformation and abnormal development of swim bladders in some hatchery-bred *Physoclistous* fish in Japan. *Journal of the World Aquaculture Society* 25, 64-77.

Kitano, T., Takamune, K., Kobayashi, T., Nagahama, Y. y Abe, S.I. 1999. Suppression of P450 aromatase gene expression in sex-reversed males produced by rearing genetically female larvae at a high water temperature during a period of sex differentiation in the Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*). *Journal of Molecular Endocrinology* 23, 167-176.

Kitano, T., Takamune, K., Nagahama, Y. y Abe, S.I. 2000. Aromatase inhibitor and 17alpha-methyltestosterone cause sex-reversal from genetical females to phenotypic males and suppression of P450 aromatase gene expression in Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*). *Molecular Reproduction and Development* 56, 1-5.

Koumoundouros, G., Gagliardi, F., Divanach, P., Boglione, C., Cataudella, S. y Kentouri, M. 1997. Normal and abnormal osteological development of caudal fin in *Sparus aurata* L. fry. *Aquaculture* 149, 215-226.

Koumoundouros, G. Divanach, P. Anezaki, L. y Kentouri, M. 2001: Temperature-induced ontogenetic plasticity in sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Marine Biology* 139, 817-830.

Lall, S.P. y Lewis-McCrea, L.M. 2007. Role of nutrients in skeletal metabolism and pathology in fish-an overview. *Aquaculture* 267, 3-19.

Laurel, B. J. y Blood, D. M. 2011. The effects of temperature on hatching and survival of northern rock sole larvae (*Lepidopsetta polyxystra*). *Fishery Bulletin* 109, 282-291.

Lewis-McCrea, L. M., Lall, S. P, Witten, P. E. 2004: Morphological descriptions of the early stages of spine and vertebral development in hatchery-reared larval and juvenile Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*). *Aquaculture* 241, 47-59.

Little, A.G., Kunisue, T., Kannan, K. y Seebacher, F. 2013. Thyroid hormone actions are temperature-specific and regulate thermal acclimation in zebrafish (*Danio rerio*). *BMC Biology* 11, 26.

Livak, K.J. y Schmittgen, T.D. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-(\Delta\Delta C(T))}$ . *Methods* 25, 402-408.

Lozán, J.L. 1992. Sexual differences in food intake, digestive tract size, and growth performance of the dab, *Limanda limanda* L. *Netherlands Journal of Sea Research* 29, 223-227.

Lund, I., Steenfeldt, S.J. y Hansen, B.W. 2007. Effect of dietary arachidonic acid, eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid on survival, growth and pigmentation in larvae of common sole (*Solea solea* L.). *Aquaculture* 273, 532-544.

Lund, I., Steenfeldt, S.J., Banta, G. y Hansen, B.W. 2008. The influence of dietary concentrations of arachidonic acid and eicosapentaenoic acid at various stages of

larval ontogeny on eye migration, pigmentation and prostaglandin content of common sole larvae (*Solea solea* L.). *Aquaculture* 276, 143-153.

Macqueen, D.J., Robb, D.H., Olsen, T., Melstveit, L., Paxton, C.G. y Johnston, I.A. 2008. Temperature until the 'eyed stage' of embryogenesis programmes the growth trajectory and muscle phenotype of adult Atlantic salmon. *Biology Letters* 4, 294-298.

Manchado, M., Infante, C., Asensio, E. y Cañavate, J.P. 2007. Differential gene expression and dependence on thyroid hormones of two glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenases in the flatfish Senegalese sole (*Solea senegalensis* Kaup). *Gene* 400, 1-8.

Manchado, M., Infante, C., Asensio, E., Planas, J.V. y Cañavate, J.P. 2008a. Thyroid hormones down-regulate thyrotropin beta subunit and thyroglobulin during metamorphosis in the flatfish Senegalese sole (*Solea senegalensis* Kaup). *General and Comparative Endocrinology* 155, 447-455.

Manchado, M., Salas-Leiton, E., Infante, C., Ponce, M., Asensio, E., Crespo, A., Zuasti, E. y Cañavate, J.P. 2008b. Molecular characterization, gene expression and transcriptional regulation of cytosolic HSP90 genes in the flatfish Senegalese sole (*Solea senegalensis* Kaup). *Gene* 416, 77-84.

Manchado, M., Infante, C., Rebordinos, L. y Cañavate, J.P. 2009. Molecular characterization, gene expression and transcriptional regulation of thyroid hormone

receptors in Senegalese sole. *General and Comparative Endocrinology* 160, 139-147.

Marchand, O., Duffraisse, M., Triqueneaux, G., Safi, R. y Laudet, V. 2004. Molecular cloning and developmental expression patterns of thyroid hormone receptors and T3 target genes in the turbot (*Scophthalmus maximus*) during post-embryonic development. *General and Comparative Endocrinology* 135, 345-357.

Miwa, S. y Inui, Y. 1991. Thyroid hormone stimulates the shift of erythrocyte populations during metamorphosis of the flounder. *Journal of Experimental Biology* 259, 222-228.

Miwa, S., Yamano, K., Inui, Y. 1991. Thyroid hormone stimulates gastric development in flounder larvae during metamorphosis. *Journal of Experimental Biology* 261, 424-430.

Miwa, S., Tagawa, M., Inui, Y. y Hirano, T. 1988. Thyroxine surge in metamorphosing flounder larvae. *General and Comparative Endocrinology* 70, 158-163.

Ottesen, O. H. y Bolla, S. 1998. Combined effects of temperature and salinity on development and survival of Atlantic halibut larvae. *Aquaculture International* 6, 103-120.

Parra, G. y Yúfera, M. 2001. Comparative energetics during early development of two marine fish species, *Solea senegalensis* (Kaup) and *Sparus aurata* (L). *Journal of Experimental Biology* 204, 2175-2183.

Pavlov, D.A. 1997. Development of head skeleton and paired fin girdles in wolffish, *Anarhichas lupus*, at different temperature regimes. *Journal Ichthyology* 37, 294-303.

Piferrer, F. 2001 Endocrine sex control strategies for the feminization of teleost fish. *Aquaculture* 197, 229-281.

Piferrer, F. 2013. Epigenetics of sex determination and gonadogenesis. *Developmental Dynamics*, 242, 360-370.

Polo, A., Yufera, M. y Pascual, E. 1991. Effects of temperature on egg and larval development of *Sparus aurata* L. *Aquaculture* 92, 367-375.

Quéro J. C., Desoutter M. y Lagardeére F. 1986. Cynoglossidae. En: Whithead P.J.P., Bauchott M.L., Hureau J.C., Nielsen J. y Tortonese E. (Eds). Fishes of the north-eastern Atlantic and the Mediterranean, Volume III. Paris: UNESCO, pp 1325-1328.

Real Academia Española. 2001. Diccionario de la lengua española (22<sup>a</sup> ed.). Consultado en <http://lema.rae.es/drae/?val=acuicultura>.

Rijnsdorp, A.D. y Ibelings, B. 1989. Sexual dimorphism in the energetics of reproduction and growth of North Sea plaice, *Pleuronectes platessa* L. *Journal of Fish Biology* 35, 401-115.

Salas-Leiton, E., Coste, O., Asensio, E., Infante, C., Cañavate, J.P. y Manchado, M. 2012. Dexamethasone modulates expression of genes involved in the innate immune system, growth and stress and increases susceptibility to bacterial disease in Senegalese sole (*Solea senegalensis* Kaup, 1858). *Fish Shellfish Immunology* 32, 769-778.

Sánchez, P., Ambrosio, P.P. y Flos, R. 2010. Stocking density and sex influence individual growth of Senegalese sole (*Solea senegalensis*). *Aquaculture* 300, 93-101.

Schreiber, A.M. y Specker, J.L. 2000. Metamorphosis in the summer flounder, *Paralichthys dentatus*: thyroidal status influences gill mitochondria-rich cells. *General and Comparative Endocrinology* 117, 238-250.

Seikai, T., Tanangonan, J.B. y Tanaka, M. 1986. Temperature influence on larval growth and metamorphosis of Japanese Flounder *Paralichthys olivaceus* in the Laboratory. *Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries* 52 (6), 977-982.

Shi, Y.B., Wong, J., Puzianowska-Kuznicka, M. y Stolow, M.A. 1996. Tadpole competence and tissue-specific temporal regulation of amphibian metamorphosis: roles of thyroid hormone and its receptors. *BioEssays* 18, 391-399.

Shikano, T., Shimada, Y. y Nakamura, A. 2007. Chromatophore distribution and inferior performance of albino Japanese flounder *Paralichthys olivaceus* with special reference to different chromatophore expression between albinism and pseudo-albinism. *Journal of Experimental Zoology Part A: Ecological Genetics Physiology* 307, 263-273.

Soares, F., Engrola, S. y Dinis, M.T. 2001. Anomalías en la pigmentación de juveniles de lenguado (*Solea senegalensis*). *Boletín del Instituto Español de Oceanografía* 18, 405-408.

Solbakken, J.S., Norberg, B., Watanabe, K. y Pittman, K. 1999. Thyroxine as a mediator of metamorphosis of Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus* L.). *Environmental Biology of Fishes* 56, 53-65.

Steinbacher, P., Marschallinger, J., Obermayer, A., Neuhofer, A., Sanger, A.M. y Stoiber, W. 2011. Temperature-dependent modification of muscle precursor cell behaviour is an underlying reason for lasting effects on muscle cellularity and body growth of teleost fish. *Journal of Experimental Biology* 214, 1791-1801.

Strobl-Mazzulla, P.H., Lethimonier, C., Gueguen, M.M., Karube, M., Fernandino, J.I., Yoshizaki, G., Patino, R., Strussmann, C.A., Kah, O. y Somoza, G.M. 2008. Brain aromatase (Cyp19A2) and estrogen receptors, in larvae and adult pejerrey fish *Odontesthes bonariensis*: Neuroanatomical and functional relations. *General and Comparative Endocrinology* 158, 191-201.

Takeuchi, T., Dedi, J., Ebisawa, C., Watanabe, T., Seikai, T., Hosoya, K. y Nakazone, J.I. 1995. The effect of betacarotene and vitamin A enriched *Artemia* nauplii on the malformation and color abnormality of larval Japanese flounder. *Fisheries Science* 61, 141-148.

Taylor, L.H., Hall, B.K., Miyake, T. y Cone, D.K. 1994. Ectopic ossicles associated with metacercariae of *Apophallus brevis* (Trematoda) in yellow perch, *Perca flavescens* (Teleostei): development and identification of bone and chondroid bone. *Anatomy and Embryology* 190, 29-46.

Valente, L.M.P., Moutou, K.A., Conceição, L.E.C., Engrola, S., Fernandes, J.M.O. y Johnston, I.A. 2013. What determines growth potential and juvenile quality of farmed fish species? *Reviews in Aquaculture* 5, S168-S193.

Van, Nes, S. y Andersen, O. 2006. Temperature effects on sex determination and ontogenetic gene expression of the aromatases *cyp19a* and *cyp19b*, and the estrogen receptors *esr1* and *esr2* in atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*). *Molecular Reproduction and Development* 73, 1481-1490.

Vernetti, C.H.M.M., Rodrigues, M.D.N., Gutierrez, H.J.P., Calabuig, C.P., Moreira, C.G.A., Nlewadim, A.A. y Moreira, H.L.M. 2013.

Villalta, M., Estévez, A. y Bransden, M.P. 2005. Arachidonic acid enriched live prey induces albinism in Senegal sole (*Solea senegalensis*) larvae. *Aquaculture* 245, 193-209.

Villamizar, N., Ribas, L., Piferrer, F., Vera, L.M. y Sanchez-Vazquez, F.J. 2012. Impact of daily thermocycles on hatching rhythms, larval performance and sex differentiation of zebrafish. *Plos One* 7, e52153. Genes involved in sex determination and the influence of temperature during the sexual differentiation process in fish: A review. *African Journal of Biotechnology* 12, 2129-2146.

Viñas, J., Asensio, E., Cañavate, J.P. y Piferrer, F. 2012. Gonadal sex differentiation in the Senegalese sole (*Solea senegalensis*) and first data on the experimental manipulation of its sex ratios. *Aquaculture* 12, 384-386.

Yamaguchi, T., Yamaguchi, S., Hirai, T. y Kitano, T. 2007. Follicle-stimulating hormone signaling and Foxl2 are involved in transcriptional regulation of aromatase gene during gonadal sex differentiation in Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 359, 935-940.

Yamano, K. y Miwa, S. 1998. Differential gene expression of thyroid hormone receptor alpha and beta in fish development. *General and Comparative Endocrinology* 109, 75-85.

Yamano, K., Araki, K., Sekikawa, K. y Inui, Y. 1994a. Cloning of thyroid hormone receptor genes expressed in metamorphosing flounder. *Developmental Genetics* 15, 378-382.

Yamano, K., Takano-Ohmuro, H., Obinata, T. y Inui, Y. 1994b. Effect of thyroid hormone on developmental transition of myosin light chains during flounder metamorphosis. *General and Comparative Endocrinology* 93, 321-326.

Youson, J.H. 1997. Is Lamprey Metamorphosis Regulated by Thyroid Hormones? *American Zoologist* 37, 441-460.

Yufero, M., Parra, G., Santiago, R. y Carrascosa, M. 1999. Growth, carbon, nitrogen and caloric content of *Solea senegalensis* (Pisces: Soleidae) from egg fertilization to metamorphosis. *Marine Biology* 134, 44-49.