

**IRTA**

RECERCA | TECNOLOGIA  
AGROALIMENTÀRIES



Universitat  
Autònoma  
de Barcelona

REQUERIMIENTOS NUTRICIONALES EN ÁCIDOS  
GRASOS ESENCIALES Y ORGANOGÉNESIS DE  
LA LARVA DEL LENGUADO SENEGALÉS,  
*Solea senegalensis* (Kaup, 1858)

TESIS DOCTORAL

Mireia Villalta Compte  
Barcelona, 2007



UNIVERSITAT AUTÒNOMA DE BARCELONA

FACULTAT DE VETERINÀRIA

DEPARTAMENT DE BIOLOGIA ANIMAL, DE BIOLOGIA

VEGETAL I D'ECOLOGIA

TESIS DOCTORAL

REQUERIMIENTOS EN ÁCIDOS GRASOS ESENCIALES Y

ORGANOGENÉISIS DE LA LARVA DEL LENGUADO

SENEGALÉS, *Solea senegalensis* (Kaup, 1858)

Mireia Villalta Compte



Memoria presentada por:

**Mireia Villalta Compte**

para optar al grado de Doctor

DIRECTORES DE TESI:

**ALICIA ESTÉVEZ GARCÍA**

**FRANCESC PADRÓS BOVER**

El trabajo experimental de esta Tesis doctoral ha sido realizado en el  
Institut de Recerca i Tecnologia Agroalimentàries (IRTA)

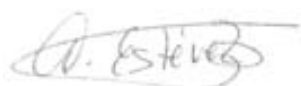


**Dra. Alicia Estévez García** investigadora del Centre d'Aqüicultura de l'Institut de Recerca i Tecnologia Agroalimentàries.

**Dr. Francesc Padrós Bover** responsable del servicio de Diagnòstic Patològic en Peixos de la Universitat Autònoma de Barcelona.

CERTIFICAN:

Que la memoria titulada: Requerimientos en ácidos grasos esenciales y organogénesis de la larva del lenguado senegalés, *Solea senegalensis* (Kaup, 1858), presentada por Mireia Villalta Compte, describe el trabajo de Tesis realizado bajo su dirección y, considerando que reúne todos los requisitos legales, autorizan su presentación y defensa para optar al grado de Doctor en Acuicultura por la Universitat Autònoma de Barcelona.



Dra. Alicia Estévez García



Dr. Francesc Padrós Bover





**Als meus pares.**

*Agradecimientos*

Primero quiero expresar mi más profundo agradecimiento a la Dra. Alicia Estévez, directora de este trabajo. Siempre aprecié su honestidad, su predisposición permanente e incondicional por aclarar mis dudas, su amistad. Me siento privilegiada por haber podido ser tu estudiante.

Y no menos importante para este trabajo ha sido el Dr. Francesc Padrós, el cual asumió la co-dirección y me dedicó parte de su valioso tiempo.

A l'Agència de Gestió d'Ajuts Universitaris i de Recerca (AGAUR) de la Generalitat de Catalunya, pel finançament atorgat a través de la concessió d'una beca predoctoral per a la formació de personal investigador.

A Porcellet S.L., pel suport econòmic desinteressat en aquests últims mesos en que no he gaudit de beca.

I'm most grateful to Dr. J. Gordon Bell and Dr. Matthew P. Bransden, both of them gave me very useful ideas and comments for my work and answered so kindly and thoroughly my questions. They made many contributions to making the papers a reality.

All the biochemical analyses were carried out at the Unit of Aquaculture Nutrition (Institute of Aquaculture), University of Stirling. I wish to express my gratitude to the staff and especially to James Dick, Fiona Strachan and Dr. Jim Henderson for the help provided as well as their encouragement during my work there.

Al Dr. Pedro Cañavate y a al Dra. Victoria Anguís (IFAPA "El Toruño" (Cádiz)), quienes generosamente me donaron los huevos de *Solea senegalensis* y

sin los cuales este trabajo no se hubiera podido llevar a cabo. Aunque no tenga el placer de conocerles quiero hacerles participes de mis agradecimientos.

Als companys del Departament de Biologia de la Facultat de Veterinària de la UAB, per acollir-me en les temporades en que envaïa el seu laboratori.

Hi ha un grup de persones que ha estat fonamental per al desenvolupament d'aquesta tesi, son tots els meus companys de l'IRTA. En particular vull agrair a Joaquin, Magda, Gloria, Noelia, Rafel i Xavi el seu ajut en el cultiu larvari, en l'obtenció de les preses vives i en el manteniment dels tancs i dels cubilets. A Olga, per la seva inestimable ajuda en els moments en els que em sentia desbordada, gràcies a ella vaig poder realitzar tot el treball en els dies de mostreig. A les companyes de la sala de becàries Gemma, Mar, Merche i Noèlia. A Maria amb qui he compartit un munt de confidències; per haver mantingut la nostra amistat en els moments bons i no tant bons; per haver estat quan l'he necessitada. A tots els demás, que amb les seves constants mostres d'interès i suport em van ajudar dia a dia.

I per últim i sobretot a Joan, per la seva comprensió i paciència durant tots aquests anys, per confiar en mi incondicionalment i per aguantar totes les meves "neures". Mai podràs imaginar tot el suport que m'has donat.

A tots, moltes gràcies!!

<b>PRÓLOGO</b> .....	1
<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	5
1.1. Generalidades sobre el lenguado senegalés ( <i>Solea senegalensis</i> Kaup, 1858).....	7
1.1.1. Taxonomía y distribución geográfica .....	7
1.1.2. Morfología externa.....	8
1.1.3. Biología .....	9
1.2. Situación del lenguado senegalés en la investigación y la acuicultura.....	11
1.3. Métodos para la obtención de larvas de lenguado senegalés.....	14
1.3.1 Incubación de los huevos .....	14
1.3.2. Cultivo larvario .....	14
1.3.3. Alimentación larvaria .....	15
1.4. Los ácidos grasos en la alimentación de peces marinos.....	18
1.4.1. Biosíntesis.....	18
1.4.2. Funciones de los ácidos grasos poliinsaturados .....	21
1.5. Despigmentación en peces planos.....	23
1.6. Estudios dosis-respuesta .....	25
1.7. Estudios histológicos de desarrollo y organogénesis en larvas de peces planos.....	27
<b>2. MATERIAL Y MÉTODOS COMUNES</b> .....	29
2.1. Preparación de emulsiones para enriquecimiento .....	31
2.2. Enriquecimiento presas vivas.....	32
2.2.1. Enriquecimiento de rotíferos .....	32
2.2.2. Producción y enriquecimiento de nauplios de <i>Artemia</i> .....	33
2.3. Cultivo larvario .....	34
2.3.1. Condiciones físico-químicas.....	35
2.3.2. Alimentación larvaria .....	36
2.3.3. Muestreos.....	37
2.4. Análisis de lípidos.....	39
2.4.1. Extracción de lípidos totales.....	39
2.4.2. Preparación y purificación de los ésteres metílicos de los ácidos grasos (FAMEs).....	40

2.5. Análisis de eicosanoides .....	42
2.5.1. Extracción de eicosanoides.....	42
2.5.2. Análisis por inmunoensayo .....	43
2.6. Métodos histológicos.....	44
2.6.1. Técnica en parafina .....	45
2.6.2. Técnica de inclusión en resina plástica .....	46
3. OBJETIVOS.....	49
4. CAPÍTULO I: Cultivo larvario del lenguado senegalés sin necesidad de utilizar rotíferos .....	53
4.1. Introducción.....	55
4.2. Material y métodos.....	56
4.2.1. Larvas .....	56
4.2.2. Condiciones de cultivo.....	56
4.2.3. Alimentación.....	57
4.2.4. Muestreo .....	58
4.2.5. Estadística.....	59
4.3. Resultados .....	59
4.4. Discusión .....	63
5. CAPÍTULO II: Las presas vivas enriquecidas en ARA provocan albinismo en las larvas del lenguado senegalés .....	69
5.1. Introducción.....	71
5.2. Material y métodos.....	73
5.2.1. Emulsiones experimentales .....	73
5.2.2. Enriquecimiento de las presas vivas .....	73
5.2.3. Cultivo larvario .....	75
5.2.4. Análisis de lípidos .....	77
5.2.5. Estadística.....	77
5.3. Resultados .....	78
5.3.1. Composición lipídica de las presas vivas .....	78
5.3.2. Efectos sobre las larvas .....	79
5.3.3. Efectos de la dieta sobre la composición de lípidos y ácidos grasos de los tejidos larvarios.....	83
5.4. Discusión .....	89

<b>6. CAPÍTULO III: Distintas concentraciones de DHA en la dieta provocan efectos en el crecimiento, en la supervivencia y en el perfil de ácidos grasos de los tejidos de las larvas del lenguado senegalés .....</b>	<b>101</b>
6.1. Introducción.....	103
6.2. Material y métodos.....	104
6.2.1. Emulsiones experimentales .....	104
6.2.2. Enriquecimiento de las presas vivas .....	106
6.2.3. Cultivo larvario .....	106
6.2.4. Análisis de lípidos .....	108
6.2.5. Estadística.....	108
6.3. Resultados .....	109
6.3.1. Composición lipídica de las presas vivas .....	109
6.3.2. Efectos sobre las larvas .....	109
6.3.3. Efectos de la dieta sobre la composición de lípidos y ácidos grasos de los tejidos larvarios.....	111
6.4. Discusión .....	115
<b>7. CAPÍTULO IV: Efectos del EPA sobre el crecimiento, la supervivencia, la pigmentación y la composición en ácidos grasos de las larvas del lenguado senegalés .....</b>	<b>127</b>
7.1. Introducción.....	129
7.2. Material y métodos.....	130
7.2.1. Emulsiones experimentales .....	130
7.2.2. Enriquecimiento de las presas vivas.....	131
7.2.3. Cultivo larvario .....	133
7.2.4. Análisis de lípidos .....	135
7.2.5. Estadística.....	135
7.3. Resultados .....	136
7.3.1. Composición lipídica de las presas vivas .....	136
7.3.2. Efectos sobre las larvas.....	136
7.3.3. Efectos de la dieta sobre la tasa de pigmentación.....	140
7.3.4. Efectos de la dieta sobre la composición en lípidos y ácidos grasos de los tejidos de las larvas .....	140
7.4. Discusión .....	144

<b>8. CAPÍTULO V: El ácido araquidónico, la relación ARA/EPA, el ácido estearidónico y los eicosanoides, están implicados en el albinismo inducido por la dieta. ....</b>	<b>149</b>
8.1. Introducción.....	151
8.2. Material y métodos.....	153
8.2.1. Emulsiones experimentales .....	153
8.2.2. Enriquecimiento de las presas vivas .....	156
8.2.3. Cultivo larvario .....	156
8.2.4. Análisis bioquímico.....	158
8.2.5. Estadística.....	159
8.3. Resultados .....	159
8.3.1. Perfil de ácidos grasos de las emulsiones y de la <i>Artemia</i> .....	159
8.3.2. Efectos sobre las larvas .....	161
8.3.3. Bioquímica larvaria .....	162
8.4 Discusión .....	164
<b>9. CAPÍTULO VI: Estudio morfológico e histológico del desarrollo larvario del lenguado senegalés.....</b>	<b>173</b>
9.1. Introducción.....	175
9.2. Material y métodos.....	176
9.2.1. Estudio cuantitativo del desarrollo de la glándula tiroides.....	178
9.3. Resultados .....	178
9.3.1. Tegumento .....	178
9.3.2. Sistema respiratorio.....	182
9.3.3. Pseudobranquia.....	184
9.3.4. Tracto digestivo, reservas endógenas, hígado y páncreas .....	184
9.3.5. Órganos endocrinos .....	185
9.3.5.1. Islotes de Langerhans.....	185
9.3.5.2. Glándula tiroides .....	188
9.3.5.3. Corpúsculos de Stannius .....	188
9.3.5.4. Tejido interrenal y células cromafines.....	188
9.3.6. Riñón excretor .....	190
9.3.7. Órganos linfoides .....	191
9.3.7.1. Tejido hematopoyético renal.....	191
9.3.7.2. Bazo .....	192
9.3.7.3. Timo .....	193



9.3.8. Corazón y principales vasos sanguíneos.....	194
9.3.8.1. Corazón.....	194
9.3.8.2. Principales vasos sanguíneos.....	196
9.3.9. Vejiga natatoria .....	196
9.3.10. Encéfalo y órganos de los sentidos .....	197
9.3.10.1. Encéfalo .....	197
9.3.10.2. Neuromastos .....	200
9.3.10.3. Epitelio olfativo .....	201
9.3.10.4. Vesículas óticas .....	201
9.3.10.5. Ojos.....	201
9.4. Discusión .....	204
<i>10. CONCLUSIONES.....</i>	<i>235</i>
<i>11. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</i>	<i>239</i>
<i>12. ANEXOS.....</i>	<i>275</i>



AChE: acetilcolinesterasa  
ACTH: adrenocorticotropina  
 $\alpha$ -MSH: hormona estimulante de los melanocitos  
APROMAR: Asociación Empresarial de Productores de Cultivos marinos  
ARA: ácido araquidónico, 20:4n-6  
BHT: butilhidroxitolueno  
BW: peso corporal  
C: cloroformo  
CA-IRTA: Centre d'Aqüicultura-Institut de Recerca i Tecnologia Agroalimentàries  
COX-2: ciclooxigenasa-2  
DHA: ácido docosahexaenoico, 22:6n-3  
DM: materia seca  
DPA: ácido docosapentaenoico, 22:5n-3  
dph: días después de la eclosión  
DW: peso seco  
EFA: ácido graso esencial  
EPA: ácido eicosapentaenoico, 20:5n-3  
FA: ácido graso  
FAME: éster metílico de ácido graso  
FAO: Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación  
GLA: ácido gamma-linolénico, 18:3n-6  
HUFA: ácido graso altamente insaturado  
IEM: Índice de Migración del Ojo  
IFAPA: Instituto Andaluz de Investigación y Formación Agraria, Pesquera, Alimentaria y de la Producción Ecológica.  
JACUMAR: Junta Nacional Asesora de Cultivos Marinos  
L: luz  
LA: ácido linoleico, 18:2n-6  
LNA: ácido linolénico, 18:3n-3  
M: metanol  
MS-222: metanosulfato de triclaína  
MUFA: ácido graso monoinsaturado  
O: oscuridad  
OA: ácido oleico, 18:1n-9  
PG: prostaglandina  
PUFA: ácido graso poliinsaturado  
SD: desviación estándar  
SDA: ácido estearidónico, 18:4n-3  
SFA: ácido graso saturado  
SGR: Tasa Estándar de Crecimiento  
TFA: ácido graso total  
TLC: cromatografía en capa fina



## *PRÓLOGO*



La acuicultura se define, según la FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations), como el “cultivo de organismos acuáticos, propiedad de una persona física o jurídica, situados en áreas de tierra o costeras mediante técnicas que permiten aumentar la producción”.

La acuicultura es una actividad milenaria procedente de China, donde hace 5500 años se empezó a desarrollar mediante el simple mantenimiento de carpas en estanques naturales de agua dulce. Esta actividad se fue desarrollando y expandiendo a lo largo de los siglos, hasta que hoy en día se puede afirmar que se ha convertido en el sector de mayor crecimiento dentro de la producción de alimentos de origen animal, pasando de proveer un 3,9% del suministro mundial de pescado, crustáceos y moluscos en el año 1970, a un 29,9% en el año 2002<sup>1</sup>. Desde 1970 el sector de la acuicultura ha logrado un crecimiento medio anual del 8,9%. Durante ese mismo periodo los sistemas de producción de carne en tierra han experimentado un aumento medio anual de 2,8% y la pesca extractiva solo un 1,2% al año<sup>1</sup>. Hoy en día, China sigue siendo el mayor productor de pescado del mundo, tanto mediante la pesca extractiva, donde alcanzan unas capturas de 16,6 millones de toneladas al año, como en la acuicultura, donde su producción es de 27,7 millones de toneladas, centradas principalmente en especies continentales<sup>1</sup>.

El aumento del consumo de pescado per cápita y el crecimiento de la población han hecho que el consumo mundial de pescado pase de 28 millones de toneladas en el año 1961 a 93,3 millones de toneladas en el 2001<sup>1</sup>. En muchos países se prevé que esta tendencia seguirá aumentando en los próximos decenios. Así, solo el crecimiento de la acuicultura podrá satisfacer esta demanda creciente en cuanto a productos de la pesca, ya que se prevé un

estancamiento o lento crecimiento de la producción mediante la pesca de captura, debido principalmente a que la mayoría de los caladeros se encuentran sobreexplotados y algunas especies al borde de la extinción.

<sup>1</sup> FAO, UNESCO (2002). Informe SOFIA “*El Estado mundial de la pesca y la acuicultura*”. <http://www.fao.org>



# *1. INTRODUCCIÓN*



## 1.1. Generalidades sobre el lenguado senegalés (*Solea senegalensis* Kaup, 1858)

### 1.1.1. Taxonomía y distribución geográfica

El lenguado senegalés pertenece al orden Pleuronectiformes (Tabla 1.1), que engloba a los comúnmente denominados “peces planos” y es el único orden dentro de los vertebrados cuyos individuos presentan una simetría bilateral alterada. Dentro de este orden se incluye la familia de los soleidos, cuyos integrantes se caracterizan por presentar un hocico redondeado y la boca en posición ínfera. La familia de los soleidos (*Soleidae*) está compuesta por 22 géneros y 90 especies (Nelson, 1994). El lenguado senegalés pertenece al género *Solea*, dentro del cual se engloban 10 especies: *Solea aegyptiaca*, *S. bleekeri*, *S. elongata*, *S. fulvomarginata*, *S. kleinii*, *S. humilis*, *S. ovata*, *S. senegalensis*, *S. solea* y *S. stanalandi* (Fishbase, 2007). Existen otros dos sinónimos para nombrar a *S. senegalensis*: *S. melanochira* (Moreau, 1874) y *S. cleverleyi* (Gilchrist, 1906) (Fishbase, 2007).

La primera cita en la que se hace referencia a esta especie en el Mediterráneo corresponde al año 1920, cuando ejemplares capturados en varias localidades (Andratx, Palamós, Sant Carles de la Ràpita i Vinaròs) fueron identificados como pertenecientes a la especie *S. melanochira* (Moreau, 1874) (Sostoa, 1990).

Actualmente se considera que el lenguado senegalés se distribuye en el Océano Atlántico a lo largo de la costa este, desde Senegal hasta La Rochelle (Francia), y en el Mar Mediterráneo, a lo largo de las costas de España,

costas del norte de Túnez y Golfo de León (CIESM, The Mediterranean Science Comisión, 2002).

---

**Superclase:** GNATOSTOMADOS (*Gnathosmata*)

**Clase:** Osteictios (*Osteichthyes*)

**Subclase:** Actinopterygios (*Actinopterygii*)

**Infraclasse:** Actinopteros (*Actinopteri*)

**Superdivisión:** Neopterygios (*Neopterygii*)

**División:** Halecóstomos (*Halecostomi*)

**Subdivisión:** Teleósteos (*Teleostei*)

**Orden:** Pleuronectiformes (*Pleuronectiformes*)

**Familia:** Soleidos (*Soleidae*)

**Genero:** *Solea*

**Especie:** *senegalensis*

---

Tabla 1.1. Posición sistemática del lenguado senegalés.

### 1.1.2. Morfología externa

La talla media de un ejemplar adulto de lenguado senegalés es de 45 cm, aunque en ocasiones pueden llegar a medir 60 cm (Abellan y Basurco, 1999). Los individuos presentan sexos separados sin caracteres externos diferenciables. Su cuerpo es plano y oval, con los dos ojos en el lado derecho. La aleta dorsal se inicia por delante de los ojos, sobre el neurocráneo, y junto con la anal se extienden prácticamente por toda la periferia del cuerpo. La aleta caudal está totalmente separada de la dorsal y de la anal. La aleta pectoral del lado ocular presenta una membrana interr radial negra, carácter diferencial que permite distinguir esta especie del lenguado común *S. solea*, que presenta un punto

negro similar pero en la zona posterior de la aleta (Ben-Tuvia, 1990). La boca es semicircular y pequeña, situada en una posición ínfera, debajo del borde inferior del ojo derecho (JACUMAR (Junta Nacional Asesora de Cultivos Marinos), 2006). La coloración del lado ocular es normalmente marrón, variando de oscuro a claro y adaptándose miméticamente al entorno

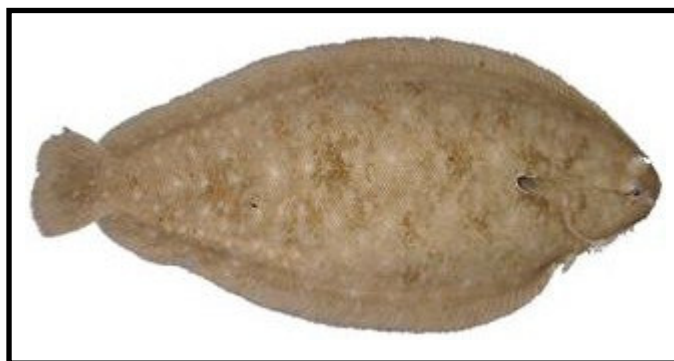


Figura 1.1. Ejemplar de lenguado senegalés adulto (Imagen cedida por Agulleiro, M.J.).

(Figura 1.1). Presenta una serie de ocelos de color azul y tamaño variable, que se disponen en filas longitudinales a lo largo del cuerpo y desaparecen después de la muerte (Abellan y Basurco, 1999).

### 1.1.3. Biología

El lenguado senegalés es un animal de hábitos bentónicos, vive en fondos arenosos, cercanos a la costa y hasta una profundidad de 100 m. Presenta unos hábitos alimentarios muy especializados basados principalmente en organismos bentónicos como poliquetos, principalmente *Hediste diversicolor*, moluscos bivalvos, principalmente *Scrobicularia plana* o pequeños crustáceos (tanaideaceos, isópodos, anfípodos y decápodos) como *Corophium* spp. (Abellan y Basurco, 1999; Cabral, 2000; Sá et al., 2003) y en algún caso vertebrados

(anguilas) (García-Franquesa et al., 1996). Es una especie gonocórica y de acuerdo a lo descrito por Dinis et al. (1999), las hembras maduran a los tres años de edad, cuando su longitud alcanza aproximadamente los 32 cm. La época de puesta se localiza principalmente en los meses de marzo y abril, aunque puede extenderse hasta el mes de junio (Dinis et al., 1999), la fecundidad media de las hembras es de aproximadamente 500.000 huevos kg<sup>-1</sup>. En ejemplares mantenidos en cautividad también se han obtenido puestas naturales en otoño, aunque de volumen considerablemente inferior a las obtenidas en primavera (Anguis y Cañavate, 2005). Tanto en primavera como en otoño, la mayoría de las puestas se obtienen dos o tres días después de registrarse cambios en la temperatura del agua (subidas superiores a 2,5 °C) (Anguis y Cañavate, 2005). El diámetro de los huevos en el momento de la puesta varía entre 929,6±0,01 µm y 960,6±0,03 µm (Dinis et al., 1999), siendo en algunos casos de hasta 962,8±51,9 µm (Mourente y Vázquez, 1996), disminuyendo a medida que la época de puesta avanza (Dinis et al., 1999). La incubación se lleva a cabo a una temperatura alrededor de 19 °C (Cañavate y Fernández-Díaz, 1999; Dinis et al., 1999). La larva eclosiona después de 48 h de incubación a 17 °C o a las 36 h si la incubación se realiza a 20°C (Dinis y Reis, 1995) con una longitud aproximada de 2,4±0,1 mm dependiendo asimismo del tamaño inicial del huevo y de la calidad de la puesta (Dinis et al., 1999). Tanto las larvas como los huevos son planctónicos, sin embargo tras varios días de vida planctónica en los que la larva se alimenta del zooplancton existente (en la naturaleza principalmente copépodos) el cuerpo va perdiendo paulatinamente su simetría bilateral, adopta una forma plana y uno de los ojos, el situado en el lado izquierdo, comienza la migración hacia el lado derecho. Este proceso, conocido como metamorfosis y que en el lenguado

senegalés dura aproximadamente una semana, generalmente se lleva a cabo desde el día 11 al día 19 después de la eclosión, siempre dependiendo de la temperatura del agua que influye tanto en el día de comienzo como en la duración de la misma. La metamorfosis termina cuando la larva comienza a migrar y a pasar cada vez más tiempo en el fondo, variando tanto sus hábitos alimentarios como su nicho ecológico.

## 1.2. Situación del lenguado senegalés en la investigación y la acuicultura

El interés por el cultivo del lenguado data de finales del siglo XIX, cuando se publicaron los primeros trabajos sobre la biología (Cunningham, 1890) y métodos de cultivo (Fabre-Domergue y Biéatrix, 1905) del lenguado común (*Solea vulgaris*). Pero no es hasta 1970 cuando la investigación sobre esta especie alcanza su punto culminante con la publicación de un mayor número de trabajos (Bromley, 1971, 1977; Alderson y Howell, 1973; Fluchter, 1973; Ramos, 1977; Fuchs, 1978; Fonds, 1979). Sin embargo, a pesar del esfuerzo investigador llevado a cabo en la década de los 70, el cultivo del lenguado no alcanzó nunca la escala comercial, ya que los problemas que planteaba la especie a nivel de alimentación y patologías no pudieron resolverse con la tecnología con que se contaba en la época (Howell, 1997). Como consecuencia, el esfuerzo investigador y la inversión comercial de los años ochenta se centró en especies menos problemáticas, como la lubina (*Dicentrarchus labrax*) o el rodaballo (*Scophthalmus maximus*) (Howell, 1997). Durante los años noventa la producción acuícola europea experimentó un gran desarrollo, alcanzándose

niveles superiores al millón de toneladas por año (APROMAR (Asociación Empresarial de Productores de Cultivos Marinos), 2006), pero presentó el inconveniente de estar centrada en un número muy reducido de especies, con lo que el mercado empezó a registrar síntomas de saturación (Dinis et al., 1999). Por ello, en los años siguientes se apostó por la diversificación de especies como posible medida correctora. Entre las distintas especies que se consideraron adecuadas para diversificar la producción acuícola (espáridos, esciánidos y soleidos) (Divanach, 2003), el lenguado senegalés contó con un gran apoyo e interés como especie adecuada para el cultivo, especialmente en las costas de la península Ibérica (Dinis, 1992; Dinis et al., 1999), debido a su elevado valor comercial en los mercados de España y Portugal (Dinis et al., 1999), y a que su cultivo en condiciones extensivas, permitía aprovechar de forma comercial áreas de marismas y esteros no utilizadas anteriormente (Drake et al., 1984). Aunque la gran mayoría de los trabajos centrados en la biología y el cultivo del lenguado senegalés se publicaron a finales de los ochenta y en la década de los noventa, por parte de grupos de investigación españoles y portugueses (Dinis et al., 1987; Dinis, 1992; Vázquez et al., 1994; Marín-Magán et al., 1995; Sarasquete et al., 1996), la primera referencia bibliográfica de esta especie data de 1979 (Lagardere et al., 1979) y trata sobre el desarrollo larvario a partir de huevos recolectados en el medio natural en las costas francesas del Atlántico.

En el año 2000 la producción del lenguado senegalés fue de 13,1 toneladas, obtenidas íntegramente en la Comunidad Autónoma de Andalucía. En Cataluña, el cultivo de esta especie se llevó a cabo principalmente en tanques instalados en tierra, alcanzando producciones de 3,6 toneladas en el año 2002. En el año 2004 la producción española de lenguado senegalés se concentró



exclusivamente en los esteros y las salinas de Andalucía (31,6 toneladas), así como en las instalaciones de la empresa Culmarex, ubicada en las Islas Baleares (26 toneladas) (JACUMAR, 2006). En el año 2006 la producción fue de 75 toneladas, distribuidas entre las comunidades de Andalucía (20 Tm), Galicia (30 Tm) y Murcia (25 Tm) (APROMAR, 2006). La empresa productora de rodaballo Stolt Sea Farm ha creado recientemente una instalación de engorde intensivo de lenguado senegalés en Porto do Son (La Coruña) y desde hace ya algunos años está investigando en la obtención de puestas y cría larvaria de esta especie.

El esfuerzo científico llevado a cabo con el lenguado senegalés no se ha visto recompensado a nivel industrial, ya que en la mayoría de casos la producción comercial de esta especie se lleva a cabo en sistemas de cultivo extensivo o semi-extensivo, con un nivel de producción final que no alcanza el nivel considerado como industrial. Esto es debido principalmente a la baja replicabilidad de los resultados obtenidos en condiciones extensivas y a que los conocimientos zootécnicos para realizar el ciclo biológico completo a través de métodos intensivos de producción, se encuentran muy repartidos entre las distintas instalaciones (Cañavate, 2005). A esto se añaden los problemas que aún plantea esta especie en términos de destete, por la mala aceptación de los piensos existentes en el mercado, y la aparición de enfermedades debidas a patógenos oportunistas que aparecen de manera imprevista (Cañavate, 2005) y que en muchos casos van unidos a subidas de temperatura en el cultivo o a la proximidad a otras especies de peces, principalmente doradas (*Sparus aurata*), de las que procede el patógeno.

### **1.3. Métodos para la obtención de larvas de lenguado senegalés**

#### **1.3.1 Incubación de los huevos**

La incubación de los huevos de *S. senegalensis* se realiza a distintas temperaturas, desde 19 °C (Cañavate y Fernández-Díaz, 1999; Fernández-Díaz et al., 2001; Morais et al., 2004b), a 20 °C (Cañavate et al., 2006) o usando rangos de temperatura entre 18 y 21 °C (Dinis et al., 1999). Generalmente la salinidad se mantiene alrededor de 36 g l<sup>-1</sup> (Morais et al., 2004b; Cañavate et al., 2006). El tanque que se utiliza para la incubación es generalmente de tipo cilindro-cónico, con volúmenes que pueden ir de 150 a 500 l y dotados de abundante aireación y renovación continua de 0,65 a 1 l min<sup>-1</sup> (Dinis, 1992; Vázquez et al., 1994; Cañavate y Fernández-Díaz, 1999; Fernández-Díaz et al., 2001; Morais et al., 2004b).

#### **1.3.2. Cultivo larvario**

Tras la eclosión las larvas son trasladadas a tanques cilindro-cónicos de 200 l (Dinis et al., 1999; Dinis et al., 2000; Morais et al., 2004b) o a tanques redondos de 400 l (Fernández-Díaz et al., 2001; Cañavate et al., 2006) o 700 l (Cañavate y Fernández-Díaz, 1999), en todos los casos, la densidad de cultivo utilizada se mantiene alrededor de las 50 larvas l<sup>-1</sup>. Si los tanques utilizados son de tipo cilindro-cónico, las larvas se someten a un nuevo traslado a tanques con fondo plano una vez completada la metamorfosis.

Los parámetros ambientales utilizados para el cultivo del lenguado senegalés son: temperatura 20±1 °C y salinidad 35±1 g l<sup>-1</sup> (Cañavate y Fernández-Díaz, 1999; Dinis et al., 1999; Dinis et al., 2000; Fernández-Díaz et

al., 2001; Morais et al., 2004b; Cañavate et al., 2006). En cuanto al fotoperiodo, las opciones llevadas a cabo en los distintos trabajos son muy diversas, se pueden citar como ejemplos: iluminación continua hasta los 21 días después de la eclosión para luego pasar a 16:8 h (L (luz) : O (oscuridad)) (Cañavate y Fernández-Díaz, 1999) o 13:11 (L:O) desde la eclosión (Dinis et al., 2000).

### 1.3.3. Alimentación larvaria

Las presas vivas son organismos producidos bajo condiciones artificiales para alimentar a estadios larvarios de peces, crustáceos o bivalvos que están siendo cultivados. Su uso permite la correcta administración de nutrientes a las larvas que no admiten una alimentación inerte, debido a su baja capacidad digestiva y al tamaño de partícula. Dentro de las presas vivas se incluyen rotíferos, nauplios de *Artemia* sp., microalgas y copépodos.

El régimen alimentario utilizado para el cultivo larvario del lenguado senegalés se basa generalmente en la utilización de rotífero (*Brachionus plicatilis*) como primera presa viva, durante los 4-6 días después de la apertura de la boca. La utilización de nauplios de *Artemia* se inicia poco después del rotífero y sigue hasta el destete con dietas inertes (Cañavate, 2005) (Figura 1.2). A partir de esta base, son muchas y diversas las pautas de alimentación seguidas en el cultivo larvario de esta especie. Algunos autores utilizan la técnica de aguas verdes descrita por Reitan et al. (1997) (Cañavate et al., 2006) durante los primeros días de alimentación con rotífero. Otros autores utilizan una cantidad de rotífero constante a lo largo de los primeros días de cultivo (Dinis et al., 2000), o bien cantidades crecientes a lo largo del tiempo (Cañavate et al., 2006). Por último, diversos autores proponen la utilización de nauplios de *Artemia*

como primera y única presa viva (Bedoui, 1995; Aragao, 1999). Tras la metamorfosis, cuando la larva pasa a ser bentónica, hay autores (Morais et al., 2004a) que utilizan metanauplios enriquecidos y posteriormente congelados.

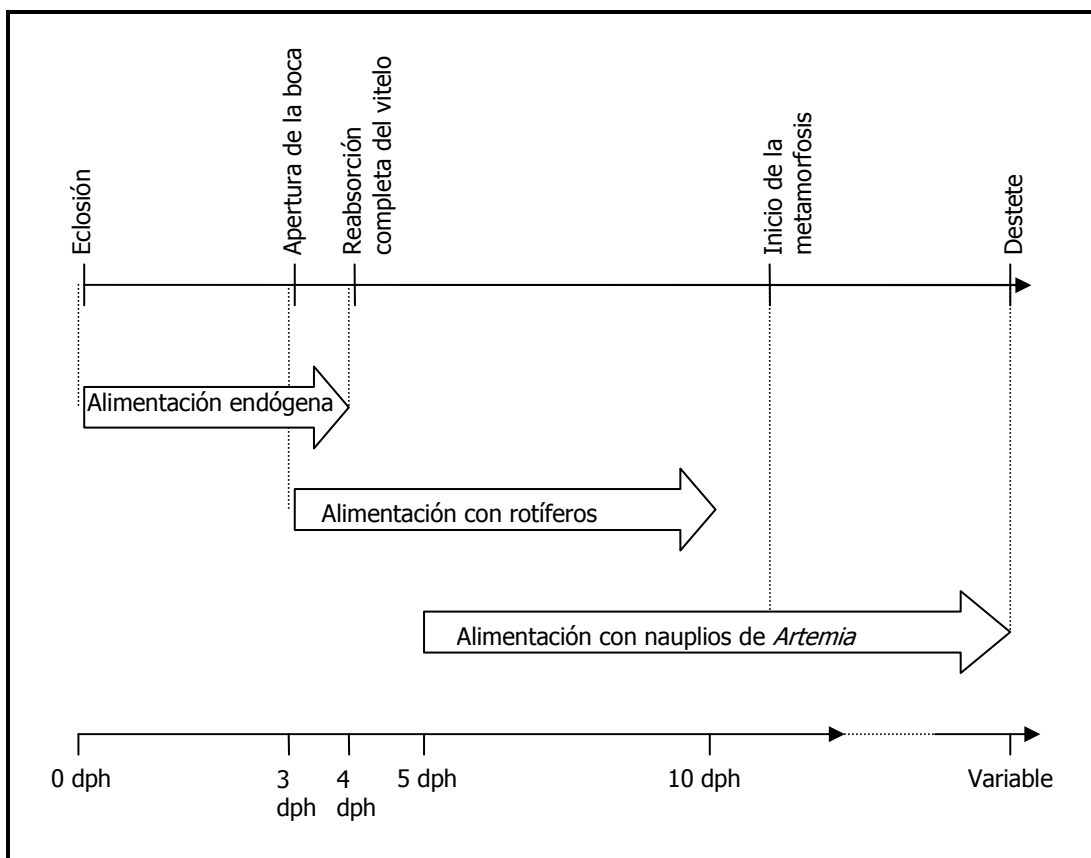


Figura 1.2. Esquema alimentario estándar para larvas de lenguado senegalés (T=19 °C). dph (días después de la eclosión).

La técnica de aguas verdes descrita por Reitan et al. (1997) se basa en la adición de microalgas a los tanques de cultivo, de este modo sirven de alimento para el rotífero evitando que pierda las características nutricionales (Howell, 1979), al mismo tiempo que se mejora el comportamiento depredador de las

larvas (Naas et al., 1992). El pequeño tamaño del rotífero, las dos especies cultivadas son *B. plicatilis*, con un tamaño de 130-340  $\mu\text{m}$  y *B. rotundiformis* con 100-210  $\mu\text{m}$ , lo convierten en la presa viva de elección para alimentar a las larvas que inician la alimentación exógena y son de pequeño tamaño, ya que las que eclosionan con un tamaño mayor pueden ingerir directamente nauplios de *Artemia*. Los nauplios de *Artemia* más utilizados en el cultivo larvario de peces pertenecen a la especie *Artemia franciscana*, con un tamaño de aproximadamente 400-600  $\mu\text{m}$ . Las ventajas de la utilización de *Artemia* son una rápida y sencilla disponibilidad de los nauplios, una buena digestibilidad, una cutícula delgada, su movimiento constante, la ausencia de respuesta de escape, el color llamativo y una buena palatabilidad (Monroig, 2006).

Tanto el rotífero *Brachionus* sp. como los nauplios y metanauplios de *Artemia* son deficitarios por naturaleza en nutrientes esenciales para el desarrollo de la larva, por lo que resulta imprescindible que pasen por un proceso de enriquecimiento, durante el cual la relativamente baja proporción inicial de estos nutrientes, o de sus precursores, se verá aumentada (Watanabe, 1993; Rainuzzo et al., 1994, 1997; Kanazawa, 1995; Sargent et al. 1997, 1999b; Ronnestad et al., 1998a). El enriquecimiento se basa en aprovechar la característica filtradora de las presas vivas, mediante la cual incorporarán en su organismo los nutrientes del enriquecedor y los vehicularán hacia las larvas. En el mercado existe una amplia gama de productos comerciales para ser utilizados como enriquecedores. Los más utilizados son las emulsiones a base de aceites de pescado o a base de derivados de algas y/o plantas ricas en determinados ácidos grasos, a los que se les añade emulsionantes más o menos naturales, como las lecitinas o la yema de huevo, o artificiales, como el Tween o el Span, también se

les puede añadir vitaminas hidro o liposolubles u otros compuestos, como pueden ser las levaduras o los hidrolizados de proteína. Otros productos utilizados como enriquecedores son los particulados, que incluyen toda una variedad de ingredientes diseñados casi “a gusto del consumidor”.

Actualmente se están investigando métodos para sustituir las presas vivas por dietas artificiales y así reducir el coste de producción durante el cultivo larvario (Yúfera et al., 1999b). Fernández-Díaz et al. (2001) utilizaron microdietas para alimentar a las larvas del lenguado senegalés, obteniendo bajas tasas de crecimiento y de supervivencia, así como una metamorfosis retardada. Demostraron que estas larvas son capaces de ingerir las dietas artificiales pero no son capaces de digerirlas completamente, por lo que la energía obtenida no era suficiente para llevar a cabo el crecimiento. Con los conocimientos que se tienen actualmente es demasiado pronto para diseñar microdietas para esta especie, pero no para utilizar la *Artemia* como única fuente de alimento larvario (Dinis et al., 1999) y así disminuir la utilización de presas vivas y por lo tanto también el coste de producción.

## **1.4. Los ácidos grasos en la alimentación de peces marinos**

### **1.4.1. Biosíntesis**

Los ácidos grasos saturados palmítico (16:0) y esteárico (18:0) pueden ser sintetizados *de novo* por todos los organismos, incluidos los peces (Sargent, 1989). Se sintetizan mediante la unión de unidades de acetyl-CoA, que tanto pueden proceder de una fuente proteica como glucídica (Tocher, 2003).

A partir de los ácidos grasos palmítico y esteárico y mediante la acción de un enzima desaturasa (eliminación de dos átomos de H y aparición de un doble enlace en la cadena de C), se obtienen los ácidos grasos palmitoleico (16:1n-7) y oleico (18:1n-9, OA), respectivamente. Este proceso también lo pueden llevar a cabo todos los organismos (Tocher, 2003). A partir del OA y mediante la acción de dos desaturasas que actúan consecutivamente, se forman los ácidos grasos

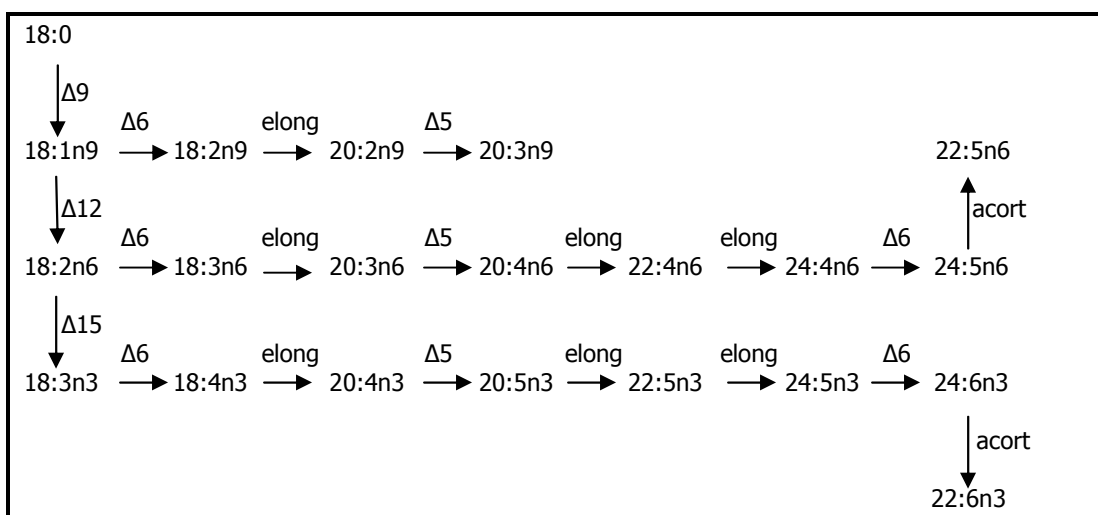


Figura 1.3. Ruta de síntesis de los ácidos grasos poliinsaturados. (Δ=desaturasa; elong=elongasa; acort=acortamiento de la cadena) (Tomado de Tocher, 2003).

linoleico (18:2n-6, LA) y posteriormente linolénico (18:3n-3, LNA) considerados los precursores del resto de ácidos grasos de cadena larga (> 20 C).

A partir del LA y mediante la acción de dos enzimas desaturasas y un enzima elongasa (adición de 2 átomos de C a la cadena) se forma el ácido araquidónico (20:4n-6, ARA) y de la misma manera, a partir del LNA se forma el ácido eicosapentaenoico (20:5n-3, EPA), el cual, tras dos elongaciones, una desaturación y un acortamiento de la cadena de C, dará lugar al ácido

docosahexaenoico (22:6n-3, DHA). Los ácidos grasos ARA, EPA y DHA se denominan poliinsaturados (en inglés PUFA), al poseer más de dos dobles enlaces en su cadena. Las reacciones de desaturación y elongación, que constituyen los pasos en las rutas de síntesis de los PUFA, se esquematizan en la Figura 1.3. Del grado de actividad de los enzimas elongasa y desaturasa que llevan a cabo estos procesos, dependerá el que una especie deba obtener cada uno de los ácidos grasos de su dieta, y de este modo satisfacer sus requerimientos (Tocher, 2003).

El principal producto de la desaturación y elongación del LNA es el DHA y de igual manera, el del LA es el ARA, aunque este ácido graso, a su vez puede ser desaturado y elongado para formar el ácido 22:5n-6 (Figura 1.3). Los animales en general, incluidos los peces, acumulan en su organismo más DHA que 22:5n-6, debido a que los enzimas que intervienen en la ruta de síntesis tienen mayor especificidad por la vía n-3 que por la n-6 (Tocher, 2003).

Los ácidos grasos LA y LNA son ácidos grasos esenciales (en inglés EFA) en la dieta de todos los vertebrados, ya que éstos carecen de las desaturasas que los forman ( $\Delta 12$  y  $\Delta 15$ ) (Tocher, 2003). Así, el único modo que tienen los vertebrados de incorporar estos ácidos grasos en el organismo es ingiriéndolos en la dieta. Los ácidos grasos ARA, EPA y DHA son ácidos grasos considerados esenciales fisiológicamente, lo que implica que las funciones que cumplen en los organismos en cuanto a estructura de membranas o síntesis de sustancias fisiológicamente activas, no pueden ser cubiertas con otros ácidos grasos.

No está del todo claro que en los peces, y especialmente en los marinos, se den las rutas de síntesis de los distintos tipos de ácidos grasos (Tocher, 2003) ya que la gran mayoría de las especies marinas cubren sus requerimientos de



ácidos grasos a través de la dieta, una situación por la que la síntesis de novo, así como los procesos de desaturación y elongación podrían estar inhibidos (Tocher, 2003). Sargent (1995) y Sargent et al. (1999a, 2002), estudiando el metabolismo de ácidos grasos en diversas especies de peces marinos, encontraron muchas evidencias por las que se podría decir que la conversión de LNA a EPA y DHA, y de LA a ARA no ocurre en este tipo de organismos, debido a que en el medio marino existe una abundante cantidad de EPA y DHA, y una menor pero también importante cantidad de ARA, formando parte de las dietas naturales de los peces (Tocher y Sargent, 1984; Mourente et al., 1991). Así pues, los peces marinos tendrían un elevado requerimiento de EFA del grupo n-3 (EPA y DHA) (Watanabe, 1982; Kanazawa, 1985), y no tan alto en lo que se refiere a los n-6 (ARA) (Sargent et al., 1999a). Estudios realizados en el *S. maximus* demostraron que esta especie marina apenas puede sintetizar EPA y ARA desde sus precursores LNA y LA respectivamente (Owen et al., 1975; Cowey et al., 1976; Rodríguez et al., 2002).

#### **1.4.2. Funciones de los ácidos grasos poliinsaturados**

Una de las principales funciones de los PUFA es formar parte de los fosfolípidos de membrana, y así participar activamente en mantener la estructura y funcionalidad (fluidez) de las membranas celulares (Sargent et al., 1999a; Tocher, 2003). Formando parte de las membranas, los PUFA juegan un importante papel en el desarrollo de la larva, así el DHA es particularmente importante en el desarrollo del tejido nervioso y de la retina, siendo el principal ácido graso presente en los fotorreceptores (conos y bastones) de esta última (Izquierdo et al., 1992; Devresse et al., 1994; Bell et al., 1995b; Estévez y

Kanazawa, 1995, 1996; Kanazawa, 1995; Rainuzzo et al., 1997; Sargent et al., 1997, 1999b). Así, Bell et al. (1995b) demostraron que la habilidad de las larvas de arenque (*Clupea harengus*) para distinguir y capturar presas vivas, especialmente en condiciones de baja iluminación, se veía afectada por la deficiencia de DHA en su alimento. En el caso de *Polydactylus sexfilis*, la deficiencia de DHA en la dieta se tradujo en cambios en el comportamiento habitual de esta especie (Masuda et al., 2001).

Otra de las funciones de los PUFA es la de convertirse en moléculas de 20 carbonos altamente bioactivas (Sargent et al., 1999a). Estas moléculas son producidas mediante una oxidación catalizada por un enzima dioxigenasa. Se han citado dos tipos distintos de dioxigenasas, la cicloxigenasa que produce derivados cíclicos tales como prostaglandinas, prostaciclina y tromboxanos, y la lipoxigenasa, que produce derivados lineales como son los leucotrienos y las lipoxinas. Todos estos derivados reciben conjuntamente la denominación de eicosanoides. Los eicosanoides son moléculas autocrinas, es decir, actúan en los alrededores de las células que los han producido y tienen una vida media corta (Sargent et al., 1999a; Tocher, 2003). En los peces, los eicosanoides intervienen en una amplia gama de funciones fisiológicas, entre las que pueden citarse las funciones reproductivas, las respuestas inflamatorias e inmunológicas, los procesos de osmoregulación o el control de la respuesta al stress (Lands, 1993; Sargent et al., 1999a; Koven et al., 2001; Tocher, 2003).

Aunque el EPA es mucho más abundante en los tejidos de los peces, en el momento de formar eicosanoides compete con el ARA, generalmente utilizado como sustrato de preferencia (Sargent et al., 1999b). Aunque el EPA también da lugar a eicosanoides, éstos son menos activos biológicamente que los derivados

del ARA (Sargent et al., 1999a, 1999b). La competencia existente entre ambos ácidos grasos, EPA y ARA, provoca que sea la proporción ARA/EPA existente en las membranas celulares, que a su vez está derivada de la composición de la dieta, la que determine el tipo y acción de los eicosanoides (Tocher, 2003).

### **1.5. Despigmentación en peces planos**

El patrón de pigmentación de los peces planos adultos cambia con relativa facilidad como respuesta mimética a modificaciones en el entorno, siguiendo lo que se denomina una respuesta morfológica (Burton y O'Driscoll, 1992; Ramachandran et al., 1996; Iwata y Kikuchi, 1998). También puede modificarse a lo largo del desarrollo larvario del animal, aunque en este caso la modificación en el patrón de coloración se produce mucho más lentamente, siguiendo lo que se denomina una respuesta fisiológica (Bolker y Hill, 2000). Sin embargo, en la gran mayoría de las especies de peces planos cultivados ocurren anomalías en la pigmentación, dando lugar a individuos total o parcialmente despigmentados en la cara ocular o anormalmente pigmentados en la cara ciega (generalmente desprovista de melanóforos) o con patrones mixtos de pigmentación. Todas estas anomalías pigmentarias confieren un aspecto “anormal” a los peces, lo que puede representar pérdidas económicas significativas para los productores, ya que los peces con una pigmentación distinta a los ejemplares salvajes ven reducido su valor comercial (Seikai, 1991; Seikai y Matsumoto, 1991; Naess et al., 1995; McEvoy et al., 1998; Estévez et al., 1999).

La composición de la dieta que ingieren las larvas es un factor crítico en el control de la despigmentación de los peces planos (Kanazawa, 1995; Rainuzzo et al., 1997; Sargent et al., 1997; Mangor et al., 1998; Ronnestad et al., 1998a). La mayoría de trabajos en este campo se han dirigido fundamentalmente hacia dos tipos de nutrientes muy importantes para el desarrollo larvario de los peces, la vitamina A, implicada en los procesos de osificación, visión y formación de la piel (Kanazawa, 1993; Dedi et al., 1995; Estévez y Kanazawa, 1995; Takeuchi et al., 1995, 1998; Ronnestad et al., 1998a, 1998b) y los ácidos grasos (DHA y EPA) cuya importancia en la formación de las membranas celulares ya ha sido comentada anteriormente (Izquierdo et al., 1992; Watanabe, 1993; Rainuzzo et al., 1994; Estévez y Kanazawa, 1995; Sargent et al., 1999b).

Ciertos autores (Kanazawa, 1993; Reitan et al., 1994; McEvoy et al., 1998) observaron una mejora parcial en el porcentaje de pigmentación, cuando se aumentó la cantidad de DHA presente en la dieta de las larvas, aunque el origen del problema no se supo si radicaba en los bajos niveles de DHA de la dieta o en la descompensación en la relación DHA/EPA (Devresse et al., 1994; Rainuzzo et al., 1994; Sargent et al., 1997, 1999b). Reitan et al. (1994) obtuvieron juveniles de *S. maximus* con una pigmentación completamente normal mediante el uso de presas vivas enriquecidas en ácidos grasos que presentaban una relación DHA/EPA de 2:1, el mismo que presentan los vitelos de la mayoría de huevos y larvas de peces marinos (Tocher y Sargent, 1984).

Hoy en día, aun se desconoce si las anomalías en la pigmentación están causadas por una deficiencia de DHA o un exceso de EPA (Bell et al., 2003). El problema es que es prácticamente imposible manipular el nivel de DHA sin alterar al mismo tiempo el nivel de EPA (Sargent et al., 1999b). Además, el EPA

está relacionado con la producción de eicosanoides, por lo que se hace necesario tener en cuenta al mismo tiempo al ARA, principal productor de éstos (Sargent et al., 1999b). Así, es la relación DHA/EPA/ARA de la dieta, la que pasa a tener mayor importancia, ya que, elevando el nivel de DHA se reduce el de EPA, alterando la relación EPA/ARA. Como consecuencia aparece un exceso de ARA, que provoca una sobreproducción de eicosanoides, lo cual induce a un stress bioquímico en el pez que se traduce en la aparición de una pigmentación anormal (Sargent et al., 1999b).

## **1.6. Estudios dosis-respuesta**

Los requerimientos nutricionales de los peces generalmente son estimados empíricamente. Del nutriente que se quiere analizar se fabrican dietas con niveles graduales del mismo (“dosis”) y una dieta basal en la que el nutriente no está presente. Después de un periodo determinado de tiempo, en el que se alimenta a los peces con dichas dietas, se cuantifica el crecimiento, la composición corporal, la supervivencia y/o cualquier otra variable que se considere necesaria para evaluar la respuesta del animal al nutriente en cuestión (“respuesta”) (Shearer, 2000).

Determinar los requerimientos nutricionales de ácidos grasos en larvas de peces que ingieren presas vivas es extremadamente complicado (Bransden et al., 2005a). Tradicionalmente estos estudios se llevan a cabo mediante el enriquecimiento de las presas vivas con preparados comerciales, generalmente en forma de emulsión, que suelen contener otros nutrientes esenciales además

del que se quiere estudiar. Por lo tanto, en el momento de evaluar los resultados observados en las larvas es difícil identificar si estos son debidos al ácido graso que se está estudiando, a los nutrientes que están presentes en distintas concentraciones en los preparados comerciales o a una interacción entre ellos (Bransden et al., 2005a). Además no hay que perder de vista el efecto que el propio metabolismo de las presas vivas tiene sobre el preparado comercial, como ocurre en el caso de los nauplios de *Artemia* que realizan una rápida retroconversión de DHA a EPA (Navarro et al., 1999).

Actualmente es posible encontrar en el mercado aceites derivados de pescado, microalgas, hongos y otros microorganismos que contienen grandes y variables cantidades de ácidos grasos esenciales (ARA, EPA y DHA). Combinando estos aceites con otros componentes (emulsionantes, vitaminas, etc.), pueden desarrollarse emulsiones con distintas concentraciones del ácido graso que se quiere estudiar, manteniendo los otros nutrientes esenciales constantes (Bransden et al., 2005a) y teniendo siempre en cuenta a la hora de formular la emulsión, el efecto que la propia presa viva en cuestión ejercerá sobre la composición final.

Este tipo de diseño dosis-respuesta utilizando presas vivas ha sido ampliamente utilizado a la hora de establecer los requerimientos nutricionales de las larvas de varias especies de peces marinos como *Pagrus major* (Izquierdo et al., 1989), *Dentex dentex* (Mourente et al., 1999), *Morone chrysops* (Harel et al., 2000), *S. aurata* (Rodríguez et al., 1994, 1997; Koven et al., 2003), *Gadus morhua* (Bransden et al., 2005c) y *Latris lineata* (Bransden et al., 2004, 2005d, 2005e).

## 1.7. Estudios histológicos de desarrollo y organogénesis en larvas de peces planos

Obtener información sobre los patrones de organogénesis, de desarrollo morfológico y de crecimiento de las larvas es importante para el desarrollo de la acuicultura de la especie estudiada, ya que permiten obtener datos cruciales que ayudan a entender cómo es la larva en cada momento de su desarrollo y así mejorar las técnicas de cultivo larvario utilizadas en cada una de estas fases de su evolución (Blaxter, 1988; Bengtson, 1999; Koumoundouros et al., 1999). Dentro de este tipo de estudios, es tal vez el sistema digestivo el que ha recibido una mayor atención, ya que sus cambios ontogénicos están en muchos casos asociados al proceso de captación, procesado y asimilación de alimento. Por lo tanto el conocimiento de su desarrollo puede permitir una mayor comprensión de la fisiología nutricional de la larva (Gisbert et al., 2004), lo que permite establecer una adecuada pauta de alimentación, como por ejemplo en el caso de la transición a alimento inerte (Hamlin et al., 2000).

Son numerosos los trabajos en los que se estudia el sistema digestivo de diversas especies de peces planos, como son *S. solea* (Boulhic y Gabaudan, 1992), *Limanda ferruginea* (Baglolle et al., 1997), *Paralichthys californicus* (Gisbert et al., 2004), *Paralichthys olivaceus* (Tanaka et al., 1996), *Paralichthys dentatus* (Bisbal y Bengtson, 1995), *Hippoglossus hippoglossus* (Blaxter et al., 1983; Luizi et al., 1999) o *S. maximus* (Cousin et al., 1987; Segner et al., 1994). En el mismo sentido, también son abundantes los trabajos en los que se estudian los cambios de algunos caracteres morfológicos a lo largo del desarrollo y en algunos casos,

estos cambios se clasifican y se establecen estadios y subestadios de desarrollo. Las especies en las que se han elaborado este tipo de trabajo son *S. maximus* (Al-Maghazachi y Gibson, 1984; Segner et al., 1995), *P. olivaceus* (Minami, 1982; Fukuhara, 1986), *Limanda yokohamae* (Fukuhara 1988) o *Pleuronectes flesus* (Hutchinson y Hawkins 2004). En cambio, los trabajos centrados en otros órganos o sistemas en particular son más escasos. Hay algunos trabajos sobre la piel de *P. olivaceus* (Hiroi et al., 1998), de *H. hippoglossus* (Ottesen y Olafsen, 1997), o de *Pleuronectes platessa* (Roberts et al., 1973), sobre la vejiga natatoria de *S. solea* (Boulhic y Gabaudan, 1992), sobre el ojo de *H. hippoglossus* (Kvenseth et al., 1996), sobre los órganos linfoides de *S. maximus* (Padrós et al., 1996) o sobre los órganos endocrinos de *L. yokohamae* (Tanaka et al., 1995). Sin embargo, en el lenguado senegalés los cambios morfológicos que tienen lugar durante el desarrollo y la metamorfosis de las larvas aún no han sido descritos. La única clasificación que existe para el desarrollo de la larva de lenguado senegalés (Fernández-Díaz et al., 2001), se centra únicamente en las distintas posiciones en las que se va localizando el ojo izquierdo a lo largo de la metamorfosis, prescindiendo de caracteres morfológicos igualmente importantes como pueden ser la torsión de la notocorda o la formación de las aletas y sus radios. En cuanto a estudios histológicos, los trabajos sobre esta especie, al igual que lo que ocurre para las otras especies de peces planos, se centran principalmente en el sistema digestivo (Sarasquete et al., 1996; Ribeiro et al., 1999; Fehri-Bedoui et al., 2000), aunque también es posible encontrar algunos trabajos centrados en otros temas, como pueden ser la zona anterior del sistema nervioso central (Piñuela et al., 2004) o el desarrollo osteológico y las anomalías esqueléticas de la larva (Gavaia y Cancela, 2002).



## *2. MATERIAL Y MÉTODOS COMUNES*



## 2.1. Preparación de emulsiones para enriquecimiento

Para la preparación de las emulsiones de enriquecimiento utilizadas en las distintas experiencias se utilizaron los siguientes productos comerciales:

1. Neuromins<sup>®</sup> (Martek Bioscience, USA), obtenido del crecimiento del alga *Cryptocodinium cohnii*, rico en DHA.
2. Vevodar<sup>®</sup> (DSM Food Specialties, Holanda), obtenido del crecimiento del hongo *Mortierella alpina*, rico en ARA.
3. Croda<sup>®</sup> (Incromege EPA500TG, Reino Unido), compuesto por triglicéridos de aceite de pescado, rico en EPA.
4. Aceites vegetales, dentro de los cuales se utilizaron el aceite de canola, rico en ácido oleico, el aceite de soja, rico en ácido linoleico y el aceite de *Echium plantagineum* rico en LA, LNA, ácido estearidónico (18:4n-3, SDA) y 18:3n-6.
5. Aceite de oliva, se utilizaron tanto la variedad Frantoio, proveniente de Lakelands (Australia), como la variedad Cornicabra, proveniente de los Montes de Toledo, ambas ricas en OA y contenido bajo en palmítico.
6. Suplementos, se utilizaron la lecitina de soja como emulsionante, y la vitamina E como antioxidante.

En determinados casos se utilizó para el enriquecimiento una emulsión comercial, DHA Protein Selco<sup>®</sup> (INVE, Bélgica).

En los distintos experimentos se obtuvieron emulsiones con nulo, bajo, medio y alto contenido en el ácido graso que se quería estudiar en cada caso. Las emulsiones se prepararon según lo descrito por Dunstan et al. (2003). Se mezclaron, en distintas cantidades según los casos, los productos citados anteriormente, se añadió agua destilada y se procedió a emulsionar mediante la

acción de un Ultra-turrax T25 (IKA, Alemania) durante 60 segundos. Las emulsiones se transfirieron a jeringas de plástico, se eliminó el aire residual y se almacenaron, en posición vertical, a 4 °C.

## **2.2. Enriquecimiento presas vivas**

### **2.2.1. Enriquecimiento de rotíferos**

Los rotíferos *B. plicatilis*, cepa L, que se utilizaron para alimentar a las larvas durante los primeros días de cultivo provinieron de los tanques de cultivo de esta especie que se mantienen continuamente en la sección de cultivos auxiliares en el CA-IRTA (Centre d'Aqüicultura - Institut de Recerca i Tecnologia Agroalimentàries). Cada día se extrajeron de estos tanques el número de rotíferos necesarios, se lavaron con agua de mar filtrada para eliminar los restos de fitoplancton y levadura y se depositaron en los tanques de 10 l donde se efectuaba el enriquecimiento. La densidad utilizada para el enriquecimiento del rotífero fue de 500 rotíferos ml<sup>-1</sup> y la cantidad de enriquecedor 0,1 gr l<sup>-1</sup>. Tras 12 h de enriquecimiento, los rotíferos se concentraron y lavaron con agua marina para eliminar el exceso de grasa y posteriormente con agua dulce durante 1 minuto para disminuir la posible carga bacteriana. Seguidamente se alimentó a las larvas con las cantidades adecuadas para cada tanque en una única toma diaria. Durante toda la manipulación de los rotíferos, tanto el agua de mar como el agua dulce que se utilizaron fueron tratadas con luz ultravioleta para eliminar la posible contaminación y se mantuvieron a 20 °C para prevenir un posible choque térmico en el rotífero.

### 2.2.2. Producción y enriquecimiento de nauplios de *Artemia*

En la mayoría de las experiencias presentadas en este trabajo se utilizaron nauplios de *Artemia* (*A. franciscana*) pertenecientes a la cepa EG (“enrichment grade”, INVE, Bélgica) procedente del lago salado de Uta, USA. En el caso particular en que se valoraron los requerimientos en ácido eicosapentaenoico, se utilizó la *Artemia persimilis* (procedente de los lagos Colorada Grande y Salitral Negro, provincia de La Pampa, Argentina) debido al nulo contenido de esta especie en EPA. El método utilizado para la eclosión de los quistes fue similar en las dos especies, variando únicamente en los parámetros utilizados. Los quistes de *A. franciscana* fueron eclosionados con fuerte aireación e iluminación continua, en agua de mar a 28 °C mientras que para la eclosión de los quistes de *A. persimilis* se utilizó una mezcla de agua de mar y agua dulce para producir una salinidad del 18 gr l<sup>-1</sup>, se mantuvieron a 25 °C, con una aireación e iluminación similar. En ambos casos, el periodo de incubación se mantuvo alrededor de las 24 h, tras las cuales se detuvo la aireación consiguiendo que los nauplios eclosionados migraran al fondo del tanque y se separaran de las cáscaras vacías, que se mantuvieron en superficie. Los nauplios eclosionados se obtuvieron por simple decantación y se transfirieron a tanques de 10 l con abundante aireación. Se extrajeron varias alícuotas de 1 ml para hacer un recuento de los individuos obtenidos en cada eclosión y así calcular la densidad total y por lo tanto, el volumen de nauplios necesario para ser transferido a cada uno de los tanques de enriquecimiento. La densidad utilizada para el enriquecimiento de los nauplios de *Artemia* fue de 100 nauplios ml<sup>-1</sup> y la cantidad de enriquecedor 0,6 gr l<sup>-1</sup>. Dado que es necesario que los nauplios estén en estadio instar II (abertura del digestivo) para comenzar el enriquecimiento,

los nauplios se mantuvieron en agua limpia durante 6 h. Tras 18 h de enriquecimiento, los nauplios se concentraron y lavaron con agua marina para eliminar el exceso de grasa y posteriormente con agua dulce durante 15 min para disminuir la posible carga bacteriana. Seguidamente se alimentó a las larvas con las cantidades adecuadas para cada tanque repartidas en dos tomas diarias. La cantidad de nauplios a repartir en la segunda toma se mantuvo a 4 °C para evitar desenriquecimiento.

En el caso de *A. persimilis*, además, teniendo en cuenta la situación del CA-IRTA dentro del parque natural del Delta de l'Ebre, se procedía cada día a recoger todos aquellos quistes no eclosionados en filtros de papel que posteriormente fueron secados e incinerados. Asimismo se tuvo especial cuidado en que ninguno de los nauplios utilizados pudiera salir de la zona de producción de *Artemia* o de la sala de cultivo larvario.

### **2.3. Cultivo larvario**

Los huevos de lenguado senegalés utilizados en la mayoría de las experiencias fueron generosamente donados por el IFAPA (Instituto Andaluz de Investigación y Formación Agraria, Pesquera, Alimentaria y de la Producción Ecológica) “El Toruño” (Pto. de Sta. María, Cádiz), obtenidos a partir de puestas naturales de reproductores mantenidos en cautividad en sus instalaciones, y transportados por carretera hasta el CA-IRTA, las larvas eclosionaron durante el transporte. El cultivo larvario se llevó a cabo con una densidad de 50 larvas  $\text{litro}^{-1}$  en 12 tanques de malla (150  $\mu\text{m}$ ) de 35 litros de capacidad. En los tanques se

dispusieron aireadores y air-lifts que permitieron un cierto grado de renovación del agua al mismo tiempo que mantenían las presas vivas en suspensión en toda la columna. Los 12 tanques estuvieron distribuidos en dos tanques de 1500 l (Figura 2.1), conectados a su vez a un módulo de recirculación de agua provisto de filtro mecánico de hasta 1  $\mu\text{m}$ , filtro biológico y filtro ultravioleta a fin de mantener constantes las condiciones físico-químicas y microbiológicas del agua (Carbó et al., 2003).

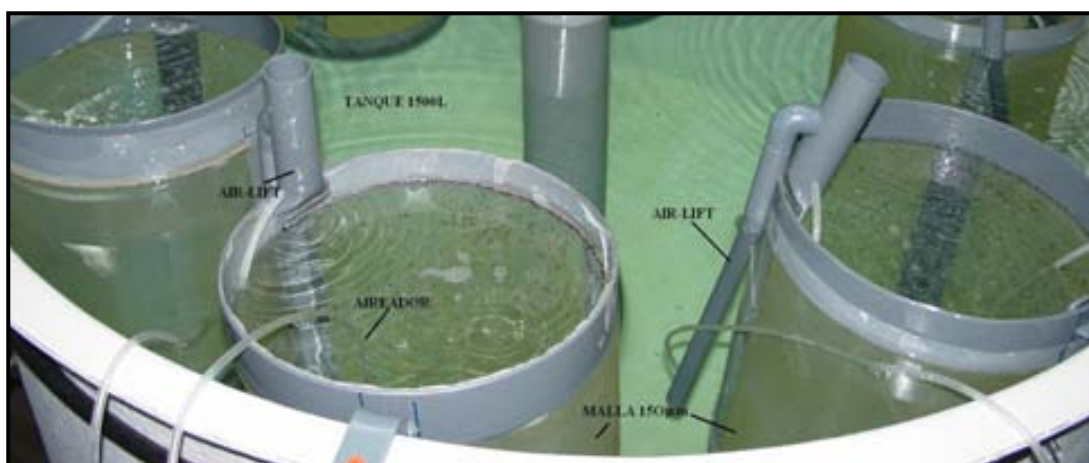


Figura 2.1. Detalle de uno de los tanques de 1500 l en el que se observan los tanques de malla de 35 l con aireadores y air-lifts.

### **2.3.1. Condiciones físico-químicas**

Las larvas se mantuvieron bajo condiciones de fotoperiodo 18:6 h (L:O). La temperatura del agua fue de  $19 \pm 1$  °C, la salinidad de  $36 \pm 1$  gr  $\text{l}^{-1}$ , el oxígeno  $8 \pm 1$  mg  $\text{l}^{-1}$  y el pH  $8 \pm 0,5$ . Los niveles de nitritos y amonio se mantuvieron en  $0,012$ - $0,036$  mg  $\text{l}^{-1}$  y  $0,14$ - $0,22$  mg  $\text{l}^{-1}$ , respectivamente. En algunas experiencias se utilizó la técnica de aguas verdes (Reitan et al., 1997) durante los primeros diez días de cultivo, no se usó en todos los casos ya que las microalgas hubieran

podido interferir en el suministro de ácidos grasos. Esta técnica se llevó a cabo mediante la adición de 30 litros de cultivo concentrado de *Isochrysis galbana* y *Nannochloropsis gaditana*. A partir del día 10 de cultivo se mantuvo un caudal de 2,5 l minuto<sup>-1</sup> (renovación diaria del agua de un 200%), en las experiencias en que no se utilizó esta técnica, la renovación del agua se instauró desde el primer día de cultivo.

Diariamente se procedió al sifonado de los tanques de malla con el fin de eliminar los individuos muertos y retirar el exceso de nauplios de *Artemia* desenriquecidos, asegurando que estos no estuvieran en los tanques más de 12 h.

### **2.3.2. Alimentación larvaria**

En cada experiencia se utilizaron 12 tanques, en los que se introducían las larvas que fueron alimentadas con las presas vivas enriquecidas con las cuatro emulsiones experimentales, en grupos de tres réplicas por emulsión. Generalmente las larvas se alimentaron con rotíferos desde el día 3 al día 9 después de la eclosión, con una densidad continua de 10 rotíferos ml<sup>-1</sup>. La alimentación con nauplios de *Artemia* se inició el día 5 después de la eclosión y siguió hasta el final de las experiencias. La cantidad de nauplios de *Artemia* suministrada cada día en peso (y por consiguiente en número de nauplios) se ajustaba para que fuera el 70% del peso corporal de las larvas desde el día 5 al día 15 después de la eclosión, el 20% del día 16 al 30 y el 7% del día 31 al 37, siguiendo las indicaciones de Cañavate et al. (2006), de este modo se redujo al mínimo la cantidad de nauplios de *Artemia* no ingeridos.



### **2.3.3. Muestreos**

Se tomaron muestras de 20 larvas de cada uno de los tanques de malla antes de la distribución de las presas vivas en los días 1, 4, 6, 10, 12, 15, 20 y 30 después de la eclosión y el día de finalización de las experiencias. Las larvas se dispusieron en vasos de precipitados y fueron sacrificadas usando una concentración letal de metanosulfato de triclaína (1000 mg l<sup>-1</sup>, MS-222, Sigma). La longitud estándar fue medida usando una lupa de disección (Nikon SMZ 800) y un analizador de imágenes (Analysis, SIS GmbH, Alemania). Para calcular el peso seco se lavaron las larvas con agua destilada para eliminar los restos de sal y se dispusieron en cubreobjetos pesados previamente dentro de un horno de secado (UNB400, Memmert, Alemania) a 60 °C durante 24 h, tras las cuales se pesaron. En los mismos días de muestreo se observó el estadio de desarrollo de las larvas, teniendo en cuenta la posición del ojo izquierdo durante la migración hacia el lado derecho (Fernández-Díaz et al., 2001) (Figura 2.2). Con una pequeña variación de estos datos, los subestadios 3a y 3b pasaron a ser los estadios 3 y 4, y el estadio 4 pasó a ser 5, se calculó el Índice de Migración del Ojo (I<sub>EM</sub>),  $I_{EM} = \Sigma (\% \text{larvas en cada uno de los estadios} * \text{estadio}) / 100$  (Solbakken et al., 1999). La supervivencia y el índice de pigmentación se determinaron al final de las experiencias, por conteo de los individuos supervivientes y de los que resultaron con anomalías en la pigmentación respectivamente. En algunos casos se calculó la tasa estándar de crecimiento (día<sup>-1</sup>) ( $SGR = ((\ln \text{peso}_i - \ln \text{peso}_0) / (\text{día}_i - \text{día}_0) * 100)$  (Hopkins, 1992).

En cada día de muestreo se destinaron 20 larvas al análisis histológico. Las larvas fueron examinadas individualmente y después de determinar su longitud y el estadio de desarrollo teniendo en cuenta las principales

características morfológicas, fueron inmediatamente depositadas en casetes para histología y fijadas con formol tamponado al 10%. En cada uno de los muestreos se utilizaron 10 larvas para su inclusión en parafina y otras 10 que fueron incluidas en metacrilato.

Para el análisis bioquímico se tomaron tres réplicas, de aproximadamente 500 larvas cada una, en el día 1 después de la eclosión. Al final de las experiencias se tomaron 20 larvas-juveniles de cada uno de los tanques, fueron diseccionadas sobre hielo separando cabeza, carcasa y digestivos, y conservando los distintos tejidos por separado en una mezcla de cloroformo-metanol. También se tomó una muestra de 30 individuos completos, 20 para el análisis de lípidos y 10 para el análisis de eicosanoides. Para el análisis bioquímico de las distintas emulsiones y de las presas vivas se tomaron muestras, al menos por triplicado, tanto antes como después del proceso de enriquecimiento.

Todas las muestras para análisis de lípidos se dispusieron directamente en cloroformo:metanol (2:1, v:v) (C:M) y fueron almacenadas en atmósfera de nitrógeno a -20 °C hasta el posterior análisis. Las muestras para análisis de eicosanoides se dispusieron en una solución compuesta por 3 ml de solución salina Hank's (HBSS, PAA Laboratories GmbH, Austria), 0,45 ml de etanol 100% y 0,15 ml de ácido fórmico 2M, para más tarde ser almacenadas a -20 °C.

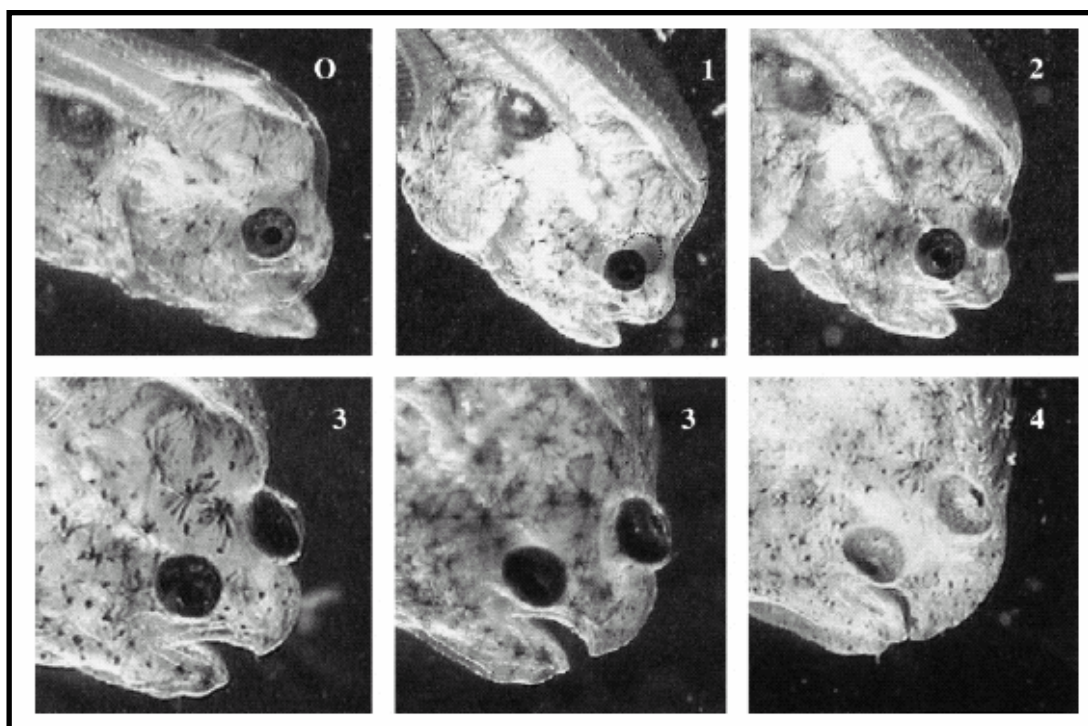


Figura 2.2. Posición del ojo en las distintas fases de la metamorfosis del lengüado senegalés. Foto extraída de Fernández-Díaz et al. (2001).

## 2.4. Análisis de lípidos

### 2.4.1. Extracción de lípidos totales

Los lípidos totales de las distintas muestras se extrajeron usando el método de Folch et al. (1957). Se pesó 1 gr de cada una de las muestras con una aproximación de dos decimales y se añadieron 16 ml de C:M, durante todo el proceso se mantuvieron los tubos sumergidos en hielo. Se homogenizaron las muestras en un Ultra-turrax T25 (IKA, Alemania) y se dejaron en hielo durante 1 hora, para posteriormente añadir 0,25 volúmenes de una dilución acuosa

0,88% KCl. Tras la agitación de la muestra y centrifugación a 1500 rpm durante 2 min, se eliminó el sobrenadante por aspiración conservándose así solamente la fracción inferior que posteriormente se filtró a través de filtros de papel (Whatman, Reino unido) previamente lavados con C:M. El solvente se evaporó bajo flujo de nitrógeno libre de oxígeno y el extracto lipídico se transfirió a un vial previamente pesado en el que continuó la evaporación hasta el secado completo del extracto. Los viales se mantuvieron toda la noche en un desecador al vacío y al día siguiente se volvieron a pesar a fin de cuantificar gravimétricamente los lípidos totales. Para el almacenamiento del extracto lipídico los lípidos se resuspendieron en C:M, el cual contenía 0,01% de butilhidroxitolueno (BHT), a una concentración de 10 mg ml<sup>-1</sup> y se dispusieron bajo atmósfera de nitrógeno a -20 °C.

#### **2.4.2. Preparación y purificación de los ésteres metílicos de los ácidos grasos (FAMEs)**

El análisis de los ácidos grasos se realizó por cromatografía de gases, para lo que es necesario obtener los ésteres metílicos, este proceso, denominado transmetilación catalizada por ácido, se llevó a cabo mediante el método de Christie (1982). Se mezclaron 1 mg del extracto de lípidos totales y el estándar del ácido graso 17:0 en un 10% de la masa total de lípidos y se evaporó el solvente orgánico bajo flujo de nitrógeno. Al residuo obtenido se le añadió 1 ml de tolueno y 2 ml de una solución al 1% de ácido sulfúrico en metanol, la mezcla se incubó en un bloque calefactor (Grant, USA) durante 16 h a 50 °C. Para recuperar los FAMEs, a la muestra incubada se añadió 2 ml de KHCO<sub>3</sub> al 2% y 5 ml de isohexano:éter dietílico (1:1, v:v) con BHT al 0,01%. Tras la

agitación y centrifugación de la muestra a 1500 rpm durante 1 minuto, la banda superior se traspasó a otro tubo y a la banda inferior se la añadió 5 ml isohexano:éter dietílico (1:1, v:v), tras lo cual se volvió a centrifugar a 1500 rpm durante 1 minuto. La banda superior obtenida en el segundo centrifugado se añadió a la primera y ambas se evaporaron bajo flujo de nitrógeno. Los FAMES se disolvieron en 100 µl de isohexano.

Para la purificación de los FAMES se utilizó cromatografía en capa fina (TLC) en placas de gel de sílice de 20x20 cm (Silica gel 60, VWR, Reino Unido). De cada muestra se depositaron los 100 µl sobre la placa utilizando microjeringas de 50 µl (Hamilton, Suiza) y fueron eluidas mediante un solvente formado por isohexano : eter dietílico : ácido acético (90:10:1, v:v:v) durante aproximadamente 1,5 h. Para la correcta visualización de la posición de los FAMES las placas se pusieron en contacto con una solución en spray de yodo en CHCl<sub>3</sub> al 1%. Las bandas que aparecieron fueron marcadas para posteriormente poder recuperarlas por raspado con bisturí. De las virutas de silicio obtenidas se recuperaron los FAMES mediante resuspensión en 1 ml isohexano:eter dietílico (1:1, v:v) con 0,01% de BHT y 4 ml de isohexano:eter dietílico (1:1, v:v) sin BHT y posterior centrifugado a 1500 rpm durante 1 min. La fase líquida se transfirió a un tubo limpio para poder ser evaporada mediante flujo de nitrógeno. Finalmente, los FAMES purificados se resuspendieron en 1 ml de isohexano y se almacenaron bajo atmósfera de nitrógeno a -20 °C.

Los ácidos grasos se analizaron mediante cromatografía gas-líquido en un cromatógrafo Thermo Electrón TraceGC (Reino Unido) equipado con una columna capilar ZB-Wax (30 m x 0,25 mm id; Phenomenex, Reino Unido). Se utilizó un gradiente térmico de dos fases, desde 50 °C (temperatura de

inyección) a 150 °C incrementó a 40 °C min<sup>-1</sup>, posteriormente incrementó 2 °C min<sup>-1</sup>, para detenerse durante 5 min a 225 °C. Como fase móvil se utilizó hidrógeno en flujo constante (2,0 ml min<sup>-1</sup>), tanto en la inyección como en el detector de ionización de llama a 250 °C. Los ácidos grasos fueron identificados mediante comparación con estándares (Supelco Inc., Madrid) y con aceite de pescado bien caracterizado. Fueron cuantificados por el programa Chrompack para Windows (Thermo Electrón, Reino Unido) el cual utiliza promedios del factor de respuesta del estándar interno, 17:0.

## **2.5. Análisis de eicosanoides**

### **2.5.1. Extracción de eicosanoides**

Se homogenizaron los tejidos con un Ultra-turrax T25 (IKA, Alemania) en el mismo medio en que se habían almacenado. El homogenizado se centrifugó a 1500 rpm durante 5 min, después de lo cual se extrajo el sobrenadante. Para la purificación de los eicosanoides se utilizó cromatografía en columna mediante la utilización de cartuchos C18 Sep-Pak (Waters, USA). Para la activación de la columna se hicieron fluir por su interior 5 ml de metanol, seguidos de 10 ml de agua destilada, tras estos pasos previos se introdujo el sobrenadante seguido de 10 ml de agua destilada, 5 ml de etanol 15% y 5 ml hexano:cloroformo (65:35, v:v). Para la extracción y separación de los eicosanoides de la columna, se utilizaron 10 ml de acetato de etilo, recogiendo el efluente. El efluente se evaporó totalmente con nitrógeno gas y se redisolvió con 0,5 ml de metanol, tras lo cual se almacenó a -20 °C.

## **2.5.2. Análisis por inmunoensayo**

El análisis de los eicosanoides (Prostaglandinas (PG)  $F_{2\alpha}$  y  $E_2$ ) contenidos en el efluente obtenido tras la cromatografía en columna, se realizó utilizando kits de inmunoensayo (Cayman Chemical, USA), que miden las reacciones antígeno-anticuerpo en el interior de los pocillos en los que se ha introducido la muestra. La cuantificación de las prostaglandinas se basó en la competencia existente entre las PG y el conjugado PG-acetilcolinesterasa (PG-AChE), por una cantidad limitada del anticuerpo monoclonal para las PG. En todos los pocillos la cantidad introducida de PG-AChE fue constante, mientras que la cantidad de PG varió dependiendo de la muestra. Por tanto, la cantidad de PG-AChE que se pudo unir al anticuerpo durante la incubación, fue inversamente proporcional a la concentración de PG presente en las muestras (Figura 2.3). Los complejos PG-anticuerpo y PG-AChE-anticuerpo se unieron a un anticuerpo adherido previamente a las paredes de los pocillos, el resto de componentes que no se unieron a estos anticuerpos fueron eliminados mediante sucesivos lavados (Figura 2.3.3). Para el revelado se introdujo en cada pocillo una cantidad constante de reactivo de Ellman (sustrato de la AChE) la reacción enzimática posterior produce un color amarillo que puede ser leído por espectrofotometría a una longitud de onda de 412 nm (Figura 2.3.4). La intensidad del color es proporcional a la cantidad de PG-AChE unida al anticuerpo policlonal del pocillo y esta a su vez inversamente proporcional a la cantidad de prostaglandina presente. Extrapolando la cantidad de muestra presente en el pocillo a la cantidad de muestra total, se obtuvo la cantidad total de prostaglandina presente en el tejido inicial, en unidades de nanogramos de prostaglandina por gramo de peso seco del tejido.

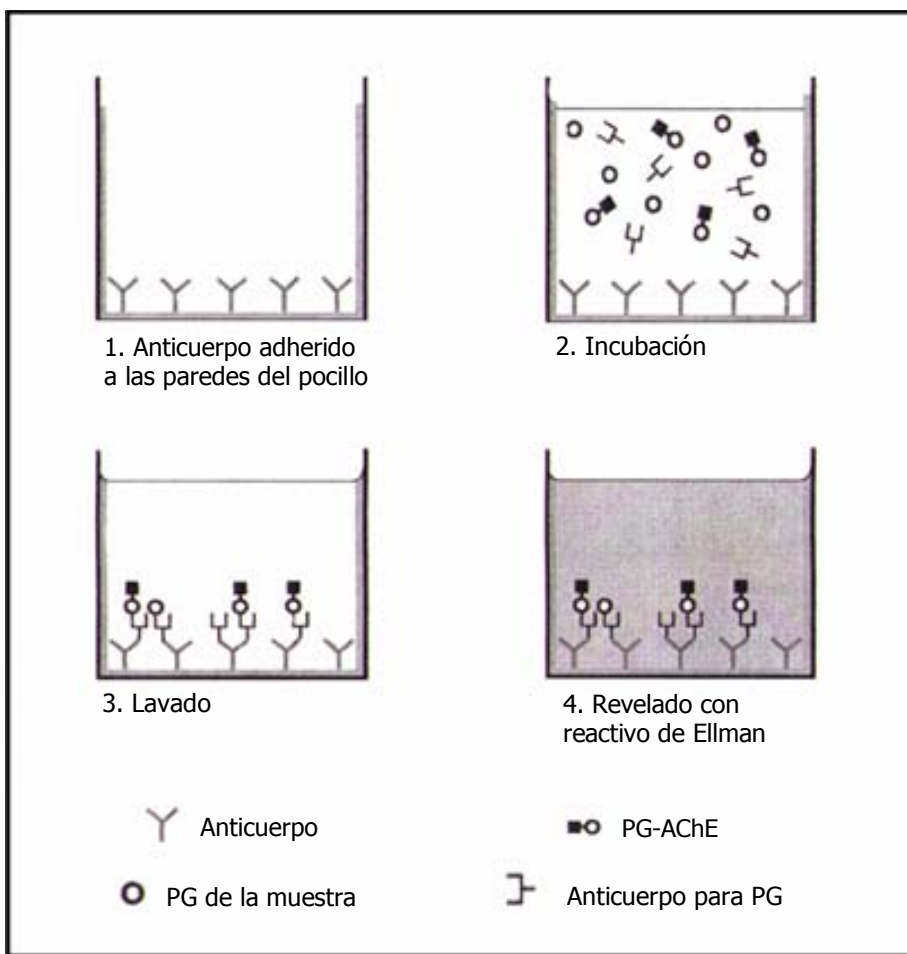


Figura 2.3. Esquema del modo de actuación del kit de inmunoensayo. Tomado de Prostaglandin  $F_{2\alpha}$  EIA Kit (Cayman Chemical, USA).

## 2.6. Métodos histológicos

Las larvas muestreadas a partir del día 25 después de la eclosión fueron sometidas a un proceso de descalcificación durante 48 h en ácido fórmico al 8%, previo a la fijación.



### **2.6.1. Técnica en parafina**

Las muestras fueron depositadas en un inclusor automático (Histolab Myr, Microm Laborgerate, España), programado con el siguiente protocolo de deshidratación e inclusión en parafina:

Formaldehído 10% : Alcohol 50° (1:1, v:v) (2 h), Alcohol 50° (1 hora), Alcohol 70° (1 hora), Alcohol 96° (1 hora), Alcohol 100° (1 hora), Alcohol 100° (1 hora), Alcohol 100° : Xilol (1:1, v:v) (1 hora), Xilol (1 hora), Xilol (1 hora).

Parafina (58-60 °C) (2 h), Parafina (58-60 °C) (2 h).

El proceso de montaje de los bloques, uno por cada larva, fue realizado en una unidad formadora de bloques con dispensador de parafina (AP280 Myr, Microm Laborgerate, España) y placa refrigeradora (300 Myr, Microm Laborgerate, España). Posteriormente se realizaron cortes seriados de 6µm en un micrótopo manual (Microm HM325, Microm Laborgerate, España), al cual se le acoplaron cuchillas de acero desechables (Feather A-35). Los cortes se depositaron directamente sobre cubreobjetos en los que previamente se habían depositado unas gotas de agua destilada. Para el estirado de los cortes, los portaobjetos se dejaron reposar hasta la completa evaporación del agua sobre una placa calefactora a 40° C.

Una vez secos los cortes, se procedió a su tinción mediante la técnica Hematoxilina-Eosina y mediante las pautas descritas a continuación:

Xilol (10 min), Xilol (10 min), Alcohol 100° (5 min), Alcohol 90° (5 min), Alcohol 70° (5 min), Agua destilada (5 min), Hematoxilina (5 min), Lavado con agua corriente (15 min), Etanol ácido (2 min), Lavado con agua corriente (5 min), Eosina (5 min),

Alcohol 96° (5 min), Alcohol 100° (5 min), Alcohol 100° (5 min),  
Xilol (5 min), Xilol (5 min).

Sin dejar que el portaobjetos se secase completamente, se procedió al montaje del cubreobjetos con Eukitt.

## **2.6.2. Técnica de inclusión en resina plástica**

Las larvas destinadas a ser incluidas en metacrilato se deshidrataron manualmente en una batería de alcohol etílico de grado creciente:

Etanol 70° (2 h), Etanol 96° (2 h), Etanol 100° (1 hora).

Seguidamente fueron traspasadas a una batería de solución de infiltración (Technovit 7100). Para llevar a cabo la pre-infiltración e infiltración se utilizaron las siguientes pautas:

Etanol 100° : Solución de infiltración (3:1, v:v) (1 hora), Etanol 100° : Solución de infiltración (2:2, v:v) (1 hora), Etanol 100° : Solución de infiltración (1:3, v:v) (1 hora), Solución de infiltración (24 h).

Una vez realizada la inclusión, se procedió a realizar el proceso de polimerización. Las larvas individualizadas fueron introducidas en moldes (Histoform Q) a los que se añadió la solución polimerizadora (Technovit 7100 + endurecedor), que se dejó endurecer durante 48 h a 60 °C. Para la formación de los bloques se utilizaron soportes plásticos (Histoblock) que se rellenaron con resina Technovit 3040. Debido a la copolimerización, los bloques de plástico quedaron firmemente unidos al metacrilato del interior de los moldes.

Se realizaron cortes seriados de 2  $\mu\text{m}$  en un micrótopo manual (Autocut 15500, Reichert-Jüng, Alemania), provisto de cuchillas desechables

Spikker (Tungste-Carbide). Los cortes se dispusieron en agua destilada para su estiramiento y se recogieron con portaobjetos, que se secaron en el interior de una estufa a 37 °C durante 24 h.

Una vez secos los cortes se tiñeron con Azul de Toluidina al 1% durante 1 minuto y se lavaron con agua corriente. Tras dejarlos secar totalmente durante 24 h se procedió a su montaje con Eukitt.



### ***3. OBJETIVOS***



Los objetivos de la presente tesis doctoral abarcan distintos aspectos del cultivo larvario del lenguado senegalés. El capítulo I se centra en el estudio de las pautas de alimentación de esta especie. Los capítulos II, III, IV y V forman una unidad temática con el objetivo de conocer los requerimientos nutricionales respecto a los ácidos grasos considerados esenciales para la mayoría de especies de peces marinos. Por último, el capítulo VI se centra en el estudio del desarrollo, tanto morfológico como histológico.

### **Capítulo I:**

El objetivo de este capítulo fue el establecimiento de las pautas más adecuadas para la alimentación de esta especie durante el cultivo larvario. Se compararon las técnicas utilizadas habitualmente y en las que se usan tanto rotíferos como nauplios de *Artemia*, con el uso de nauplios de *Artemia* como único alimento.

### **Capítulo II, III y IV:**

Para estudiar el papel de los ácidos grasos ARA, DHA y EPA sobre el desarrollo larvario de *Solea senegalensis*, se utilizaron diseños dosis respuesta. Se cuantificó el efecto de los ácidos grasos estudiados sobre el crecimiento, la tasa de metamorfosis, la supervivencia y la pigmentación de los juveniles. También se examinaron las concentraciones de los ácidos grasos presentes en la *Artemia* enriquecida, así como en los distintos tejidos de las larvas, para observar qué ácidos grasos eran metabolizados por las larvas para la obtención de energía y cuales eran almacenados en los tejidos.

## **Capítulo V:**

En este estudio se utilizaron diseños dosis respuesta con combinaciones de distintos niveles de ARA y distintas relaciones ARA/EPA. El fin fue investigar si las alteraciones pigmentarias en las larvas de lenguado senegalés, son debidas al contenido alimentario de ARA o de la relación ARA/EPA. También se investigó el efecto del aceite vegetal extraído de las semillas de *Echium plantagineum* sobre el crecimiento y el desarrollo larvario. En este estudio se utilizaron para la alimentación larvaria, tanto nauplios de *Artemia* frescos como congelados. De este modo se sumó a los objetivos de este capítulo saber si la congelación tenía algún efecto sobre la composición en ácidos grasos de los nauplios de *Artemia*.

## **Capítulo VI:**

El objetivo del último capítulo que se presenta en esta tesis fue el estudio histo-morfológico de la larva del lenguado senegalés, desde el momento de la eclosión hasta el final de la metamorfosis, con la definición de las etapas más importantes del desarrollo.



*4. CAPÍTULO I: Cultivo larvario  
del lenguado senegalés sin  
necesidad de utilizar rotíferos*



## 4.1. Introducción

La literatura publicada sobre los métodos de cultivo larvario del lenguado común (*S. solea*) es abundante y detallada (Howell, 1997), sin embargo en el caso del lenguado senegalés la literatura centrada en los aspectos nutricionales de las larvas y juveniles, así como en los métodos de cultivo larvario es muy escasa (Dinis, 1992; Cañavate y Fernández-Díaz, 1999; Martínez et al., 1999; Dinis et al., 2000; Fernández-Díaz et al., 2001). Las pautas alimentarias que se utilizan generalmente para el cultivo larvario del lenguado se basan en el uso de rotíferos durante los diez primeros días después de la eclosión y nauplios de *Artemia* desde los días 4-5 hasta el destete con dietas inertes (Dinis, 1992; Cañavate y Fernández-Díaz, 1999; Martínez et al., 1999). Las nuevas líneas de investigación para la reducción del coste de producción de las larvas se centran en la sustitución de las presas vivas por dietas artificiales (Yúfera et al., 1999b) o en el uso de pautas alimentarias diseñadas para reducir el uso de presas vivas a la vez que aceleran el crecimiento. Fernández-Díaz et al. (2001) obtuvieron bajas tasas de crecimiento y supervivencia, así como una metamorfosis retardada, al utilizar microdietas como alimento para las larvas del lenguado senegalés. Las larvas ingirieron las dietas artificiales pero la baja capacidad digestiva hizo que las reservas corporales no fueran suficientes para la transformación anatómica que se da en la metamorfosis, para el crecimiento somático y para mantener la actividad. Así, aun se tienen pocos conocimientos para diseñar microdietas adecuadas para este tipo de larvas, pero no para utilizar los nauplios de *Artemia* como única fuente de alimento durante el periodo larvario del lenguado senegalés (Dinis et al., 1999). El principal objetivo de este capítulo es comparar

la técnica utilizada habitualmente en las granjas españolas de lenguado, donde se utilizan el rotífero y los nauplios de *Artemia* como presas vivas, con el uso de nauplios de *Artemia* como única fuente de alimento. Esta comparación se llevará a cabo en términos de crecimiento, supervivencia y desarrollo larvario.

## **4.2. Material y métodos**

### **4.2.1. Larvas**

Los huevos utilizados en esta experiencia fueron generosamente donados por el IFAPA “El Toruño” (Pto. de Sta. María, Cádiz), obtenidos a partir de puestas naturales de reproductores mantenidos en cautividad en sus instalaciones. La incubación y el cultivo larvario se llevaron a cabo en doce tanques de malla (150  $\mu\text{m}$  poro) de 50 l, distribuidos en dos tanques de 1500 l. Los tanques estuvieron conectados a una unidad de recirculación (Carbó et al., 2003) que mantuvo constantes los parámetros físico-químicos y biológicos durante todo el experimento. Se distribuyeron un total de 4345 huevos en cada tanque de malla, considerando un índice de eclosión teórico del 60% y una densidad requerida de 50 larvas  $\text{litro}^{-1}$ .

### **4.2.2. Condiciones de cultivo**

Las larvas se mantuvieron bajo condiciones de fotoperiodo 12:12 h (L:O). Las condiciones de cultivo fueron las siguientes: oxígeno  $8\pm 1$   $\text{mg l}^{-1}$ , temperatura  $20\pm 1$   $^{\circ}\text{C}$ , salinidad  $36\pm 1$   $\text{g l}^{-1}$  y pH  $8\pm 0,5$ . Los niveles de nitritos y amonio se mantuvieron en  $0,012\text{-}0,036$   $\text{mg l}^{-1}$  y  $0,14\text{-}0,22$   $\text{mg l}^{-1}$ , respectivamente.

Durante los diez primeros días de cultivo se utilizó la técnica de aguas verdes (Reitan et al., 1997). Durante este periodo cada uno de los dos tanques se mantuvo en circuito cerrado y se introdujeron 30 l de cultivo concentrado de las algas *I. galbana* y *N. gaditana*. A partir del día diez se mantuvo un caudal de 2,5 l min<sup>-1</sup>, lo que permitió una renovación diaria del agua de un 200%.

### **4.2.3. Alimentación**

Se establecieron cuatro tipos de régimen alimentario, cada uno de ellos utilizado por triplicado. El grupo R se alimentó siguiendo el método de Cañavate y Fernández-Díaz (1999), se utilizaron 20 rotíferos ml<sup>-1</sup> de la cepa S-1 como primera presa viva (3,7 mg l<sup>-1</sup>, considerando el peso seco individual del rotífero de 0,185 µg (Yúfera, 1982)), seguido de 4 nauplios de *Artemia* ml<sup>-1</sup>. Los grupos A, A2 y A3 fueron alimentados exclusivamente con nauplios de *Artemia* (cepa EG, INVE). El grupo A lo hizo en la misma proporción inicial que su equivalente en peso de rotíferos del grupo R (3,7 mg l<sup>-1</sup>, que equivale a 1,3 nauplios ml<sup>-1</sup> de *Artemia*, considerando el peso seco individual de los nauplios de *Artemia* enriquecidos de 2,77 µg, observación personal). El grupo A2 se alimentó inicialmente con el doble de nauplios (2,7 nauplios ml<sup>-1</sup>) y el grupo A3 con el triple de nauplios (4 nauplios ml<sup>-1</sup>). El número de nauplios de *Artemia* suministrados fue aumentando gradualmente, siguiendo las pautas publicadas por Fernández-Díaz et al. (2001) (Tabla 4.1).

Las presas vivas fueron enriquecidas con un producto comercial (DHA Protein Selco, INVE) a razón de 0,15 g l<sup>-1</sup> durante 6 h para los rotíferos y 0,3 g l<sup>-1</sup> durante 18 h para los nauplios. Las presas vivas enriquecidas fueron concentradas y lavadas con abundante agua de mar, seguido de un baño en agua

dulce. Posteriormente las presas vivas fueron distribuidas a las larvas en dos dosis diarias. Las larvas muertas y las presas vivas desenriquecidas fueron sifonadas diariamente, asegurando que las presas vivas no permanecían en los tanques por mas de 12 h.

Grupo	R			A		A2		A3	
Edad (dph)	Rotíferos ml <sup>-1</sup>	Nauplios ml <sup>-1</sup>	mg l <sup>-1</sup>	Nauplios ml <sup>-1</sup>	mg l <sup>-1</sup>	Nauplios ml <sup>-1</sup>	mg l <sup>-1</sup>	Nauplios ml <sup>-1</sup>	mg l <sup>-1</sup>
2-5	20	-	3,7	1,3	3,7	2,7	7,4	4,0	11,1
6-10	20	-	3,7	2,8	7,8	5,8	16,1	8,7	24,1
11-15	-	4	11,1	4,8	13,3	7,8	21,6	10,7	29,6
16-30	-	5	13,9	5,8	16,1	8,8	24,4	11,7	32,4

Tabla 4.1. Suministro diario de presas vivas para cada uno de los tanques de los 4 tipos alimentarios.

#### 4.2.4. Muestreo

De cada uno de los tanques de malla y antes de la distribución de las presas, se tomaron veinte larvas en los días 4, 6, 10, 12, 15, 20 y 30 después de la eclosión. Las larvas se anestesiaron con MS-222 y se procedió a medir su talla y observar el estadio de migración del ojo según las pautas descritas por Fernández-Díaz et al. (2001). Estas mismas larvas se sacrificaron con una concentración letal de MS-222 (1000 mg l<sup>-1</sup>) y se introdujeron en un horno a 60 °C durante 24 h para determinar el peso seco. Se calculó el I<sub>EM</sub> (Solbakken et al., 1999) usando el valor medio de su posición (0-5) en cada día de muestreo. Al final del periodo de estudio se contaron el número de individuos supervivientes y se anotaron el número de individuos con alguna anomalía pigmentaria o deformación. Del total de supervivientes el 5% fueron muestreados para medir la talla y determinar el peso seco y el I<sub>EM</sub>.

#### **4.2.5. Estadística**

Todos los análisis estadísticos se llevaron a cabo utilizando el paquete estadístico Statgraphics (Microsoft Inc.). Las diferencias entre las medias de los distintos parámetros analizados se determinaron mediante en análisis de la variancia (ANOVA) de una vía, con el régimen alimentario como variable independiente, seguido de la prueba de Tukey para la comparación de medias. Como paso previo al análisis, los datos expresados en porcentajes ( $I_{EM}$ ) fueron transformados mediante la raíz cuadrada para obtener la normalidad de los valores, y debido a la alta variabilidad observada en los datos de pesos secos, se utilizó la transformación (peso seco)<sup>-0,4</sup>. En todos los casos el nivel de significación se fijó en 0,05.

#### **4.3. Resultados**

Los resultados de crecimiento se muestran en la Figura 4.1. Durante los primeros días el crecimiento en talla fue muy similar entre los distintos grupos. Se observaron diferencias significativas en los días 12, 20 y 30 (ANOVA,  $P < 0,05$ ), siendo los grupos R y A2 los que presentaron un menor y mayor incremento en talla respectivamente. La Tabla 4.2 resume los resultados obtenidos en talla y peso de las larvas, SGR y supervivencia. Solo se observaron diferencias significativas en la talla.

En la Figura 4.2 se observan los histogramas de frecuencia de las larvas en cada uno de los estadios de migración del ojo. En el último día de muestreo, la mayoría de los individuos (98%) que se alimentaron exclusivamente de nauplios de *Artemia* (grupos A, A2 y A3) habían completado la metamorfosis, mientras que en el grupo R un 15% de los individuos permanecía en estadios tempranos de metamorfosis (estadios 2 y 3). Las larvas del grupo R mostraron una metamorfosis retardada, alcanzando cada uno de los estadios con una talla menor que la de los grupos alimentados con nauplios. Se encontró una clara relación entre la talla de las larvas y la posición del ojo, que pudo ajustarse a la siguiente regresión sigmoidea:  $I_{EM} = 4,990 / 1 + (talla / 6,376)^{-11,34}$  ( $r^2 = 0,96$ ,  $n = 1483$  larvas).

	Talla (mm)	Peso seco ( $\mu$ g)	Supervivencia (%)	SGR 4-10	SGR 12-30	SGR 4-30
R	11,16 $\pm$ 2,51 <sup>a</sup>	1961,85 $\pm$ 470,21	29,05 $\pm$ 10,50	15,54	17,57	15,12
A	12,33 $\pm$ 1,72 <sup>b</sup>	2380,55 $\pm$ 229,01	35,82 $\pm$ 0,65	17,51	12,76	16,06
A2	13,50 $\pm$ 3,68 <sup>c</sup>	3933,91 $\pm$ 1849,96	32,44 $\pm$ 20,35	20,02	13,77	17,98
A3	12,60 $\pm$ 2,63 <sup>b</sup>	2893,91 $\pm$ 760,52	44,14 $\pm$ 9,94	16,77	14,00	16,98

Tabla 4.2. Talla, peso seco, supervivencia y SGR obtenidos al final del periodo de estudio. Las letras indican diferencias significativas entre los grupos (ANOVA,  $P < 0,05$ ). Se calculó la tasa estándar de crecimiento global (SGR 4-30) y la parcial para los periodos pre-metamorfosis (SGR 4-10) y metamorfosis (SGR 12-30).



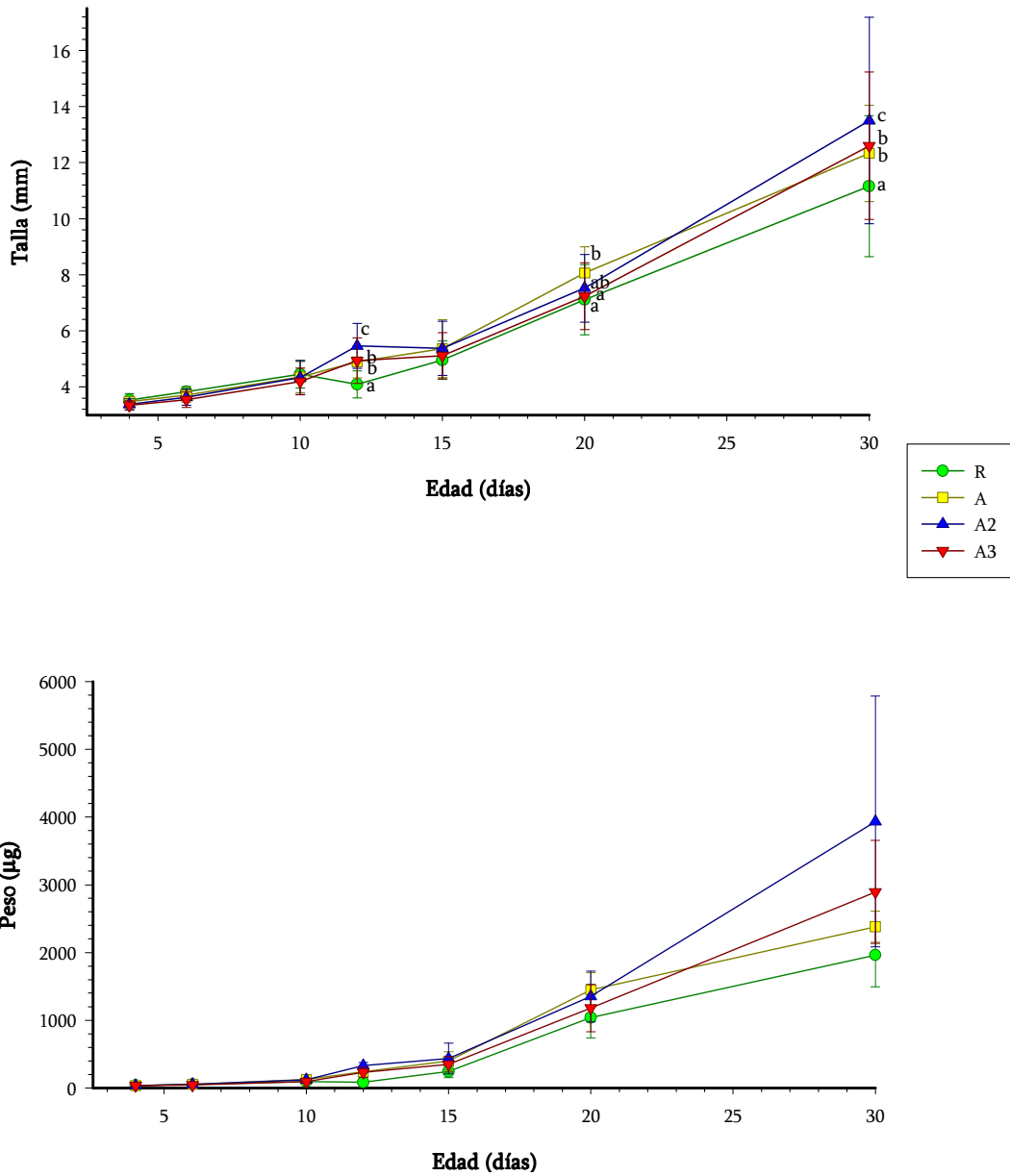


Figura 4.1. Crecimiento en talla y en peso seco de las larvas del lenguado senegalés. Los valores son medias de las tres réplicas de 20 larvas. Las barras de error representan las desviaciones estándar y las letras las diferencias significativas entre tratamientos (ANOVA,  $P < 0,05$ ).

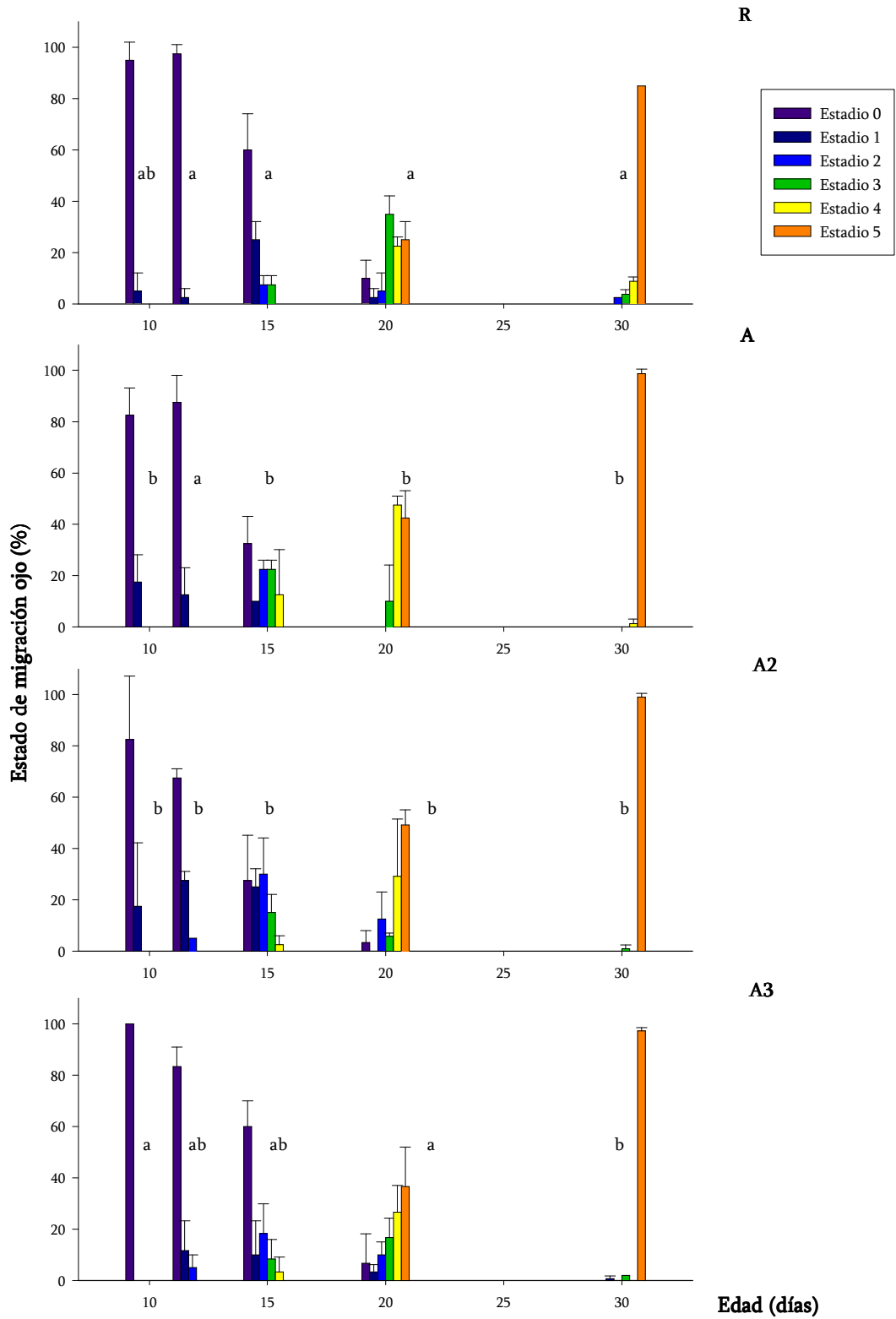


Figura 4.2. Histogramas de frecuencia de los distintos estadios de la metamorfosis en relación a la edad para los distintos grupos experimentales. Las barras de error son las desviaciones estándar y las letras indican las diferencias significativas entre los grupos (ANOVA,  $P < 0,05$ ).

---

#### 4.4. Discusión

El uso de nauplios de *Artemia* como única fuente de alimento para las larvas del lenguado común está bien documentado (Howell, 1997). Sin embargo, aunque este tipo de alimentación se haya ensayado previamente (Dinis et al., 1999) no ha sido utilizado para el cultivo industrial de *S. senegalensis*. Marín-Magán et al. (1995) describieron que las larvas del lenguado senegalés capturaban selectivamente el rotífero hasta los siete días después de la eclosión, pasando después a una preferencia por la *Artemia*, en consecuencia ellos recomendaban el uso de rotíferos hasta el día 9 después de la eclosión en la alimentación de este tipo de larvas. Los resultados del presente trabajo mostraron que las larvas del lenguado senegalés eran capaces de capturar nauplios de *Artemia* enriquecidos desde el momento de la apertura de la boca, sin ninguna diferencia significativa en cuanto a supervivencia al compararlas con las alimentadas inicialmente con rotífero. Cuando los nauplios enriquecidos estaban presentes en suficiente cantidad, el crecimiento y desarrollo larvario ocurrían más rápidamente que en las larvas alimentadas inicialmente con rotíferos.

Al final del estudio se observó un claro efecto de la cantidad de nauplios suministrados a las larvas sobre la tasa de crecimiento larvario, siendo el tratamiento A2 (8,0 mg l<sup>-1</sup>) el más efectivo. Los tratamientos con un menor (3,7

mg l<sup>-1</sup>, grupos R y A) o mayor (11,1 mg l<sup>-1</sup>, grupo A3) suministro de presas vivas, mostraron peores resultados de crecimiento. Yasunaga (1971) y Yoshimatsu y Kitajima (1996) demostraron que una ración alimentaria diaria del 40-60% del peso corporal, era el mínimo requerido para obtener resultados de crecimiento óptimos tanto en peces planos como en *P. major*. Marmulla y Rösch (1990) obtuvieron resultados similares en peces de agua dulce. En el presente trabajo, los grupos R y A recibieron raciones alimentarias en el periodo pre-metamorfosis del 35-60% y del 58-140% del peso corporal, respectivamente. Después de la metamorfosis, todos los grupos recibieron raciones por debajo del 20%, porcentaje considerado suficiente para mantener el crecimiento (Laurence, 1977), ya que durante la metamorfosis hay una disminución del metabolismo y un aumento en la eficiencia de capturas del alimento. Las bajas tasas de crecimiento que se observaron en los grupos R y A podrían ser debidas a una alimentación sub-óptima en el periodo post-metamorfosis, consecuencia de que el aumento en las raciones alimentarias no guardó relación con el aumento de la demanda por parte de la larva, aunque en todos los casos la tasa de crecimiento fue superior al 15%, considerada por Houde y Schekter (1981) como la tasa mínima de crecimiento para larvas de peces marinos. El menor crecimiento que se observó en el grupo A3 podría tener distintas explicaciones. Werner y Blaxter (1980, 1981) demostraron que las larvas de *C. harengus* mostraban bajas tasas de crecimiento cuando la densidad de presas vivas se encontraba por encima o debajo de un cierto umbral. Las larvas a las que se les suministraba una baja densidad de presas eran más eficientes en la digestión que aquellas a las que se les suministraba una elevada densidad de presas. Estas últimas evacuaban sus digestivos más rápidamente y tenían una digestión del alimento menos eficiente,

debido a que los nauplios de *Artemia* pasaban por el digestivo prácticamente intactos. Este debió ser el caso del grupo A3, donde las presas no debieron ser completamente digeridas y asimiladas. Como ha sido observado en otras larvas de peces marinos, la tasa de supervivencia y crecimiento aumenta en paralelo a la densidad de presas solo hasta cierto punto. A densidades de presas por encima de este umbral de densidad, aumentos en el número de presas disponibles no resultan en un aumento de la supervivencia, del crecimiento o del consumo de alimento.

La concentración de presas vivas y su consumo afectan a la tasa de crecimiento, al coste energético del animal para obtener alimento, y en consecuencia, a la duración del periodo larvario (Laurence, 1977; Houde y Sheckter, 1981). Por este hecho, la metamorfosis del lenguado senegalés medida de acuerdo con la posición del ojo, estaba retrasada en las larvas del grupo R a lo largo del periodo de muestreo y especialmente en el día 20. En el día 20 después de la eclosión las larvas de los grupos R y A3 mostraron los 4 estadios de migración del ojo descritos por Fernández-Díaz et al. (2001), mientras que las larvas de los grupos A y A2 estaban en estadios más avanzados (3, 4 y 5). El grupo R mantuvo este retraso en la migración hasta el final del periodo de estudio. De acuerdo con el estudio de Fernández-Díaz et al. (2001) llevado a cabo bajo las mismas condiciones de cultivo que las usadas en este trabajo, la edad y la longitud total de las larvas cuando el 50% de la población había empezado la migración del ojo variaba entre 9,4 – 15,17 días y 5,58 – 5,90 mm, respectivamente, dependiendo del tipo de alimentación. En el presente estudio, la migración del ojo empezó más tarde (13,16 – 16,06 días) pero con aproximadamente la misma longitud (5,23 – 5,75 mm). Por otro lado,

Fernández-Díaz et al. (2001) observaron que un 95% de las larvas había finalizado la metamorfosis después de 6,97 - 28,74 días, mientras que en el presente trabajo la duración de la migración del ojo fue solo de 6,83 - 7,90 días, siendo los grupos A (6,83 días) y A2 (6,95 días) los más rápidos.

Hay una clara influencia de la dieta sobre la metamorfosis de los peces planos. Hamre et al. (2002), en un trabajo multidisciplinar sobre la metamorfosis de *H. hippoglossus*, encontraron que la migración del ojo y la pigmentación de las larvas estaba afectada por las presas administradas y / o la composición de las presas. La osificación y el correcto desarrollo asimétrico del cráneo, con la subsiguiente migración del ojo, fue significativamente mejor en larvas que ingirieron zooplancton que en aquellas que ingirieron *Artemia* (Saele et al., 2003). No se encontraron diferencias significativas en la supervivencia o crecimiento hasta el día 46 después de la eclosión, aunque las larvas que comieron *Artemia* mostraron una disminución en el crecimiento después del día 45, probablemente causado por la talla pequeña de las presas, que no era suficiente para cubrir los requerimientos energéticos de las larvas (Hamre et al., 2002). La migración del ojo de las larvas que ingirieron *Artemia* se retrasó 35 días al compararlas con las larvas que ingirieron zooplancton (Solbakken et al., 2002). Por otro lado, Gara et al. (1998) no encontraron diferencias ni en el crecimiento ni en la metamorfosis entre larvas de *H. hippoglossus* que se alimentaron con los mismos nauplios de *Artemia*, pero con distintas estrategias de enriquecimiento. Estos autores encontraron una clara relación entre el índice de migración del ojo y la tasa de crecimiento de las larvas. Lo mismo se podría establecer para el lenguado senegalés (Fernández-Díaz et al., 2001, presente capítulo). Aunque no haya suficiente información para otras especies de peces

planos (*Platichthys stellatus*, Policansky, 1982; *Pleuronectes americanus*, Chambers y Leggett, 1987; *S. solea*, Amara y Lagardère, 1995), en este capítulo se considera que en futuros estudios sobre la metamorfosis de peces planos, tanto la migración del ojo como el estadio de metamorfosis se deberían relacionar con el crecimiento y / o la talla más que con la edad del pez. Una alimentación sub-óptima de las larvas debido a una talla o densidad inadecuada de las presas vivas, así como una deficiencia nutricional, causan retrasos en la migración del ojo y en la metamorfosis.

Para propósitos industriales, se pueden utilizar nauplios de *Artemia* enriquecidos como primera presa viva, ya que el crecimiento y la supervivencia son aceptables. En cambio, para estudios nutricionales, los problemas que plantean los nauplios de *Artemia* para ser enriquecidos con las cantidades adecuadas de DHA, ácidos grasos altamente insaturados (en inglés HUFA) o fosfolípidos, hacen necesaria la utilización de rotíferos como primera alimentación. Los rotíferos, en contraste con los nauplios de *Artemia*, pueden acumular ácidos grasos esenciales y fosfolípidos, alcanzando composiciones similares a los copépodos, presa natural para las larvas en condiciones de libertad (Bell et al., 2003).





*5. CAPÍTULO II: Las presas vivas enriquecidas en ARA provocan albinismo en las larvas del lenguado senegalés*



## **5.1. Introducción**

Aunque en España y Portugal haya una producción a escala industrial de juveniles de lenguado senegalés, la determinación de los requerimientos nutricionales de las larvas de esta especie aún no está completada. Los estudios nutricionales más recientes se han concentrado en los problemas durante la fase de destete (Cañavate y Fernández-Díaz, 1999; Day et al., 1999; Dinis et al., 2000; Engrola et al., 2001; Ribeiro et al., 2003) o hacia los requerimientos en aminoácidos tanto de la larva (Morais et al., 2004a) como de la etapa post-larvaria (Ronnestad et al., 2000, 2001; Aragao et al., 2004). A pesar de la importancia de los EFA (ARA, EPA y DHA) en las dietas para las larvas de los peces marinos, no existe ningún tipo de información previa sobre los requerimientos en cuanto a estos EFA por parte de la larva del lenguado senegalés. Generalmente las larvas del lenguado senegalés han sido alimentadas primero con rotíferos (desde el día 3 hasta el día 9 después de la eclosión), seguido de nauplios de *Artemia* o con *Artemia* desde el momento de la apertura de la boca (Villalta y Estévez, 2005). Las presas vivas son deficientes en EFA por naturaleza (Sargent et al., 1999b), así que es necesario, como paso previo a su utilización como alimento, que pasen por un periodo de enriquecimiento, que puede ser realizado tanto con algas, como con emulsiones de aceites o con otras preparaciones ricas en EFA y otros nutrientes esenciales. De acuerdo con lo publicado por Dinis et al. (1999), diferentes tipos de enriquecimientos de las presas vivas no demostraron ningún efecto claro de los PUFA sobre el crecimiento y la supervivencia larvaria. No obstante, un aporte adecuado de EFA durante la etapa larvaria afectará al crecimiento y a la supervivencia en

estadios posteriores del desarrollo (Howell et al., 1995). Un aporte nutricional adecuado durante la metamorfosis es particularmente crítico (Dhert et al., 1990). Estévez y Kanazawa (1995) demostraron que un aporte deficiente en EFA provocaba una metamorfosis incompleta en otras especies de peces planos.

A pesar de la gran cantidad de investigaciones que se llevan a cabo para determinar los requerimientos larvarios en PUFA n-3, solo recientemente se han tenido en cuenta los PUFA n-6 y en particular el ARA. Se ha observado que durante las épocas de ayuno, el ARA se conserva en los tejidos de los peces marinos (Izquierdo, 1996), incluido el lenguado senegalés (Mourente y Vazquez, 1996), y sirve como precursor para la biosíntesis de eicosanoides (Bell et al., 1994). Sin embargo, los altos niveles de ARA están implicados en anomalías pigmentarias (McEvoy et al., 1998a; Estévez et al., 1999; Copeman et al., 2002; Bell et al., 2003). Las anomalías pigmentarias son un grave problema en muchas de las especies de peces planos, ya que disminuyen de manera importante el valor en el mercado de los individuos afectados (Venizelos y Benetti, 1999). Así, el presente capítulo fue diseñado para investigar el papel del ARA en el crecimiento, supervivencia y pigmentación de las larvas del lenguado senegalés, desde el día 3 al día 37 después de la eclosión, usando un diseño dosis-respuesta. Además, se intentó identificar las relaciones entre los ácidos grasos presentes en la región cefálica, el digestivo y la carcasa de las larvas con aquellos presentes en la dieta, y así determinar que ácidos grasos son preferiblemente retenidos en el organismo y cuales son utilizados.

## **5.2. Material y métodos**

### **5.2.1. Emulsiones experimentales**

Se utilizaron dos tipos de aceites comerciales: Neuromins<sup>®</sup> (Martek Bioscience, USA) rico en DHA y Vevodar<sup>®</sup> (DSM Food Specialties, Holanda) rico en ARA. El aceite Vevodar<sup>®</sup> fue gradualmente reemplazado por aceite de oliva y de este modo se produjeron emulsiones con bajo (ARA-L), medio (ARA-M) y alto (ARA-H) contenido en ARA. Los componentes utilizados para la formulación de cada una de las emulsiones y la composición en ácidos grasos resultante se muestran en la Tabla 5.1. Las mezclas de aceites fueron emulsionadas con cantidades equivalentes de agua destilada y homogenizadas con un Ultra-Turrax T25 a gran velocidad, durante 60 s. Posteriormente las emulsiones se transfirieron a jeringas de plástico, procurando que no quedara aire residual en su interior, y fueron almacenadas a 4 °C hasta la utilización de las emulsiones. Como enriquecimiento de referencia se utilizó una emulsión comercial (DHA-Protein Selco, INVE).

### **5.2.2. Enriquecimiento de las presas vivas**

Los rotíferos fueron enriquecidos en contenedores de 10 l durante 12 h a 20 °C y a una densidad de 500 rotíferos ml<sup>-1</sup>, usando 0,1 g l<sup>-1</sup> de cada una de las emulsiones en cada caso. Tras las 12 h, los rotíferos fueron concentrados y lavados con agua de mar y agua dulce. Posteriormente fueron suministrados a las larvas. La *Artemia* enriquecida (cepa EG, INVE) eclosionó 6 h antes. Se dispusieron en contenedores de 10 l durante 18 h a 26 °C y a una densidad de 100 nauplios de *Artemia* ml<sup>-1</sup>, usando 0,6 g l<sup>-1</sup> de la emulsión.

	DHA-Protein Selco	ARA-L	ARA-M	ARA-H
Formulación (mg g <sup>-1</sup> )				
Vevodar <sup>®</sup>		0	150	300
Aceite vegetal <sup>a</sup>		35	18	0
Aceite de oliva		355	222	90
Neuromins <sup>®</sup>		500	500	500
Suplementos <sup>b</sup>		110	110	110
DHA-Protein Selco	1000			
TFA (mg g <sup>-1</sup> ) (DW)	100,9±15,3	283,3±24,8	331,07±35,1	265,3±31,0
Ácidos grasos				
14:0	2,0±0,1	7,9±0,5	8,5±0,5	8,5±0,5
16:0	30,8±0,3	14,9±0,2	15,7±0,2	15,6±0,2
18:0	6,0±0,1	1,8±0,1	3,0±0,1	4,1±0,1
Total saturados	43,7±1,0	24,9±2,3	27,5±1,1	28,9±0,9
16:1n-7	9,4±0,3	1,6±0,0	1,4±0,0	1,2±0,1
18:1n-9	13,1±0,2	46,7±0,2	36,4±0,1	24,7±0,0
20:1n-9	1,1±0,0	0,2±0,0	0,2±0,1	0,2±0,0
Total monoinsaturados	24,3±0,2	49,5±0,5	38,8±1,2	28,6±0,9
18:2n-6	8,8±0,5	4,4±0,2	4,1±0,1	3,9±0,2
20:2n-6	0,0±0,0	0,0±0,0	0,5±0,0	0,2±0,0
20:3n-6	0,0±0,0	0,4±0,0	0,6±0,0	1,1±0,0
20:4n-6	0,9±0,1	0,2±0,0	7,9±0,2	14,8±0,2
Total PUFA n-6	10,3±0,5	4,6±0,2	13,6±0,1	21,1±0,2
18:3n-3	1,6±0,7	0,5±0,0	0,3±0,0	0,1±0,0
20:5n-3	4,6±0,3	0,2±0,0	0,4±0,1	0,7±0,0
22:5n-3	0,9±0,0	0,1±0,0	0,2±0,0	0,6±0,1
22:6n-3	14,7±0,8	20,2±0,3	19,1±0,8	19,2±0,7
Total PUFA n-3	21,7±0,5	21,0±0,5	20,1±0,7	21,5±0,5
n-3 / n-6	2,1±0,5	4,6±0,3	1,5±0,2	1,0±0,0
DHA / EPA	3,2±0,0	101,0±1,5	47,8±8,0	27,4±4,0
ARA / DHA	0,06±0,0	0,01±0,0	0,4±0,0	0,8±0,5
ARA / EPA	0,2±0,0	1,0±0,0	19,8±3,5	21,1±0,3

Tabla 5.1. Formulación y composición en % de ácidos grasos totales (en inglés TFA) de la emulsión comercial y las emulsiones experimentales (media±SD, n=3).

Los totales incluyen algunos componentes no mostrados.

<sup>a</sup> Mezcla de aceite de canola y semilla de soja.

<sup>b</sup> Suplementos: lecitina de soja, 70 mg; vitamina E, 40 mg.

Se lavaron con abundante agua de mar y con agua dulce antes de ser suministrados a las larvas.

Para el análisis de lípidos, tanto el rotífero como la *Artemia* se muestrearon dos veces durante el periodo experimental.

### **5.2.3. Cultivo larvario**

Los huevos utilizados en esta experiencia fueron donados por el IFAPA “El Toruño” (Pto. de Sta. María, Cádiz) y obtenidos a partir de puestas de reproductores mantenidos bajo condiciones naturales de fotoperiodo y temperatura en sus instalaciones. Los huevos fertilizados fueron transportados por carretera al CA-IRTA, las larvas eclosionaron durante el trayecto. Una vez en las instalaciones donde se llevó a cabo el experimento, las larvas fueron distribuidas (50 larvas l<sup>-1</sup>) en doce tanques de malla (150 µm poro) de 35 l, distribuidos de tres en tres en cuatro tanques de 1500 l. Los tanques estuvieron conectados a una unidad de recirculación (Carbó et al., 2003) que mantuvo constantes los parámetros físico-químicos y biológicos durante todo el experimento. La temperatura del agua se mantuvo a 19±1 °C y la salinidad a 34 g l<sup>-1</sup>, las condiciones de fotoperiodo fueron de 18:6 h (L:O). Las larvas se alimentaron con rotíferos desde el día 3 al día 9 después de la eclosión, a una densidad de 10 rotíferos ml<sup>-1</sup>, y con nauplios de *Artemia* del día 5 hasta el 36 después de la eclosión. La densidad de nauplios de *Artemia* suministrados se ajustó para que fuera de un 70% del peso corporal de las larvas del día 5 al día 15, de un 20% del día 16 al día 30 y de un 7% del día 31 al día 37, siguiendo las recomendaciones de Cañavate et al. (2006), de este modo se evitó la presencia de

presas vivas desenriquecidas. Los tanques experimentales se mantuvieron en renovación continua del agua. Las presas se suministraron dos veces al día.

En los días 1, 4, 6, 10, 12, 15, 20, 30 y 37 después de la eclosión se midió la longitud estándar y se calculó el peso seco de las larvas. En cada día de muestreo se tomaron 20 larvas que fueron depositadas en vasos de precipitados y sacrificadas utilizando una concentración letal de MS-222 ( $1000 \text{ mg l}^{-1}$ ). La longitud estándar se midió utilizando un microscopio de disección (Nikon SMZ800) y un analizador de imágenes (Analysis, SIS GmBh, Alemania). Para calcular el peso seco las larvas se lavaron con agua destilada para eliminar los posibles restos de sales y se introdujeron en un horno a  $60 \text{ }^\circ\text{C}$  durante 24 h. La posición del ojo durante la metamorfosis de las larvas se estableció de acuerdo con los estadios descritos por Fernández-Díaz et al. (2001). Los datos se presentan como la cantidad de larvas en cada estadio de desarrollo para una misma edad. También se calculó el  $I_{EM}$  de acuerdo con lo descrito por Solbakken et al. (1999).

En el día 1 después de la eclosión se tomó una muestra por triplicado ( $n=1935$ ) de las larvas para un análisis bioquímico inicial. También se tomaron muestras para el análisis de lípidos en los días 15 ( $50 \text{ larvas tanque}^{-1}$ ) y 37 después de la eclosión ( $20 \text{ larvas tanque}^{-1}$ ), en este último día no solo se muestrearon larvas enteras, sino que se diseccionaron y separaron cabezas, digestivos y carcasas. Las muestras se depositaron directamente en C:M (2:1, v/v) y se almacenaron a  $-20 \text{ }^\circ\text{C}$  hasta el posterior análisis.

En el último día de muestreo se determinaron la supervivencia y las anomalías pigmentarias por conteo de los individuos restantes en los tanques. Debido a los inconvenientes que representa clasificar los distintos tipos de



anomalías pigmentarias (Bolker y Hill, 2000), tanto los individuos total como parcialmente malpigmentados, se consideraron en un único grupo.

#### **5.2.4. Análisis de lípidos**

Los lípidos totales de las presas vivas y de las larvas fueron extraídos en C:M (2:1, v/v) mediante el método de Folch et al. (1957). Tras evaporar totalmente el solvente bajo flujo de nitrógeno, las muestras fueron cuantificadas por gravimetría. Los lípidos totales fueron almacenados a -20 °C con una concentración de 20 mg lípido ml<sup>-1</sup> de C:M (2:1, v/v) y 0,01% de BHT.

La transmetilación catalizada por ácido se llevó a cabo mediante el método de Christie (1982). Los ésteres metílicos fueron extraídos utilizando isohexano : éter dietílico (1:1, v/v) y purificados en placas de TLC, para posteriormente ser analizados mediante cromatografía gas-líquido. Los picos fueron identificados mediante comparación con un estándar conocido (Supelco Inc., Madrid) y cuantificados con el programa Chrompack (Thermo Electrón, Reino Unido).

#### **5.2.5. Estadística**

Las variancias de los valores se expresan como desviaciones estándar de la media de tres réplicas. Las diferencias entre medias de los distintos tratamientos se determinaron mediante ANOVA de una vía, seguido de la prueba de Tukey para la comparación múltiple de medias. El nivel de significación se fijó en  $p \leq 0,05$ . Los valores expresados en porcentajes fueron transformados mediante el arcoseno (Sokal y Rohlf, 1995), previamente a ser analizados. Para establecer relaciones entre la alimentación y los parámetros de las larvas, se utilizaron

regresiones lineales y polinómicas. Todos los análisis estadísticos se llevaron a cabo utilizando el paquete estadístico Statgraphics (Microsoft Inc.).

### **5.3. Resultados**

#### **5.3.1. Composición lipídica de las presas vivas**

Los perfiles de ácidos grasos de las larvas iniciales (1 dph) y de la *Artemia* enriquecida con las distintas emulsiones se muestran en la Tabla 5.2. La composición de los rotíferos no se muestra debido a que se utilizaron como alimento durante muy pocos días (solo 6 días). No se encontraron diferencias significativas en los lípidos totales de los nauplios enriquecidos con las emulsiones experimentales, aunque los nauplios enriquecidos con la emulsión comercial presentaron un contenido de lípidos totales significativamente menor que aquellos enriquecidos con las emulsiones experimentales. No se encontraron diferencias significativas en el contenido de ácidos grasos saturados (en inglés SFA) y de PUFA n-3 de los nauplios enriquecidos con las emulsiones experimentales. Se encontraron diferencias significativas en las proporciones de ácidos grasos monoinsaturados (en inglés MUFA) y PUFA n-6 de los nauplios enriquecidos con las emulsiones experimentales, debido a las diferencias en OA y ARA, reflejando la composición de la emulsión. Las emulsiones experimentales con contenidos graduales de ARA, se reflejan en presas vivas con aumentos en la proporción de ARA, pero con niveles similares de DHA y EPA. Los nauplios enriquecidos con DHA-Protein Selco muestran niveles significativamente más elevados (38%) de SFA, y bajos niveles de MUFA y

PUFA n-3 (14%, debido al bajo contenido en LNA) que los enriquecidos con las emulsiones experimentales. En los nauplios de *Artemia*, las relaciones ARA/DHA y ARA/EPA variaron significativamente entre los grupos, siendo la mayor la del grupo ARA-H (1,3 y 6,0, respectivamente) y la menor la del grupo ARA-L (0,01 y 0,07, respectivamente). La relación DHA/EPA no mostró ninguna diferencia significativa entre los distintos grupos.

### **5.3.2. Efectos sobre las larvas**

Las larvas que se alimentaron con los nauplios enriquecidos con la emulsión comercial, en el día 20 mostraron tallas significativamente mayores ( $P < 0,0001$ ,  $F_{3, 1759}$ , Figura 5.1) que aquellas alimentadas con las dietas experimentales, en el día 37 sus tallas fueron significativamente mayores que las de las larvas de los grupos ARA-L y ARA-M (Figura 5.1, Tabla 5.3). Las larvas no mostraron diferencias significativas en cuanto al peso seco ( $P = 0,267$ ,  $F_{3, 189}$ ), ni para los distintos tipos de alimentación ni en los distintos días de muestreo (Figura 5.1). La supervivencia, con una media de aproximadamente el 50% para todos los grupos, no mostró diferencias significativas. Entre los días 15 y 20 se encontraron diferencias significativas ( $P < 0,05$ ) en el estadio de metamorfosis, siendo las larvas alimentadas con DHA-Protein Selco las que mostraron unos estadios más avanzados ( $I_{EM}$  2,8 y 3,83 a los 15 y 20 días, respectivamente) (Figura 5.2). En los grupos alimentados con las emulsiones experimentales, al aumentar la cantidad de ARA en la dieta, el grado de migración del ojo entre los días 15 y 20 se retrasó, siendo el grupo ARA-L el que mostró un estadio más avanzado ( $I_{EM}$  2,35 y 3,32 en los días 15 y 20 respectivamente) y

	Larvas iniciales	<i>Artemia</i>			
		DHA-Protein Selco	ARA-L	ARA-M	ARA-H
Lípidos Totales (mg g <sup>-1</sup> ) (DW)	49,3±2,5	116,3±6,4 <sup>a</sup>	132,2±5,4 <sup>b</sup>	142,9±3,7 <sup>b</sup>	132,6±5,0 <sup>b</sup>
TFA (mg g <sup>-1</sup> ) (DW)	31,7±1,6	22,0±6,5 <sup>a</sup>	30,0±5,0 <sup>b</sup>	37,4±4,8 <sup>b</sup>	28,1±4,5 <sup>b</sup>
14:0	1,4±0,5	0,5±0,0	2,8±0,2 <sup>b</sup>	2,8±0,2 <sup>b</sup>	2,3±0,2 <sup>b</sup>
16:0	21,8±0,1	25,8±0,3	12,1±0,2 <sup>a</sup>	12,1±0,2 <sup>a</sup>	12,9±0,2 <sup>a</sup>
18:0	7,0±1,7	8,4±0,1 <sup>b</sup>	4,3±0,1 <sup>a</sup>	4,3±0,1 <sup>a</sup>	5,7±0,1 <sup>a</sup>
Total saturados	31,5±1,2	38,0±1,0 <sup>b</sup>	20,3±1,0 <sup>a</sup>	20,3±1,0 <sup>a</sup>	22,1±0,2 <sup>a</sup>
16:1n-7	4,3±0,2	6,4±0,3 <sup>b</sup>	3,5±0,1 <sup>a</sup>	3,0±0,1 <sup>a</sup>	3,1±0,1 <sup>a</sup>
18:1n-9	8,8±0,2	22,0±0,2 <sup>a</sup>	43,0±0,2 <sup>b</sup>	34,4±0,2 <sup>b</sup>	28,2±0,7 <sup>b</sup>
18:1n-7	2,9±0,1	7,3±0,0	5,0±0,1 <sup>a</sup>	4,8±0,1 <sup>a</sup>	5,4±0,1 <sup>a</sup>
20:1n-11	1,1±0,5	0,0±0,0	0,4±0,0	0,4±0,0	0,3±0,1
20:1n-9	0,3±0,1	0,4±0,0	0,1±0,2	0,1±0,2	0,5±0,0
Total monoinsaturados	20,8±1,6	38,4±0,5 <sup>a</sup>	53,9±1,5 <sup>c</sup>	43,9±2,3 <sup>b</sup>	38,3±0,5 <sup>a</sup>
18:2n-6	0,9±0,0	9,0±0,5 <sup>b</sup>	7,2±0,3 <sup>a,b</sup>	6,9±0,4 <sup>a,b</sup>	6,5±0,1 <sup>a</sup>
20:2n-6	0,2±0,1	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,3±0,1
20:3n-6	0,0±0,0	0,0±0,0	0,3±0,0	0,3±0,0	0,6±0,2
20:4n-6	2,9±0,0	0,2±0,1 <sup>a</sup>	0,1±0,0 <sup>a</sup>	4,5±0,3 <sup>b</sup>	8,3±0,5 <sup>c</sup>
Total PUFA n-6	5,2±0,5	9,4±0,3 <sup>a</sup>	7,6±0,1 <sup>a</sup>	11,7±0,4 <sup>b</sup>	16,3±0,6 <sup>c</sup>
18:3n-3	0,3±0,0	4,1±0,3 <sup>a</sup>	12,5±1,1 <sup>b</sup>	11,8±1,8 <sup>b</sup>	13,6±0,5 <sup>b</sup>
20:5n-3	3,9±0,8	1,8±0,1	1,5±0,1	1,5±0,0	1,4±0,2
22:5n-3	4,1±0,6	0,3±0,0	0,2±0,0	0,2±0,0	0,1±0,0
22:6n-3	24,2±3,4	6,8±0,1	6,8±0,5	8,9±1,3	6,6±1,2
Total PUFA n-3	39,2±1,6	14,2±0,3 <sup>a</sup>	22,8±1,5 <sup>b</sup>	24,1±0,2 <sup>b</sup>	23,3±0,5 <sup>b</sup>
DHA / EPA	6,1±0,2	3,8±0,2	4,5±0,1	5,9±0,9	4,8±0,1
ARA / DHA	0,1±0,0	0,04±0,0 <sup>b</sup>	0,01±0,0 <sup>a</sup>	0,5±0,3 <sup>c</sup>	1,3±0,2 <sup>d</sup>
ARA / EPA	0,7±0,1	0,1±0,0 <sup>b</sup>	0,07±0,03 <sup>a</sup>	3,0±0,2 <sup>c</sup>	6,0±0,5 <sup>d</sup>

Tabla 5.2. Composición en % TFA de las larvas iniciales (1dph) y de los nauplios de *Artemia* enriquecidos con la emulsión comercial y con las emulsiones experimentales (media±SD,  $n = 3$ ).

Los totales incluyen algunos componentes minoritarios que no se muestran.

Los superíndices (a, b, c, d) marcan las diferencias significativas entre los tratamientos ( $P < 0,05$ ,  $F_{3,11}$ ).

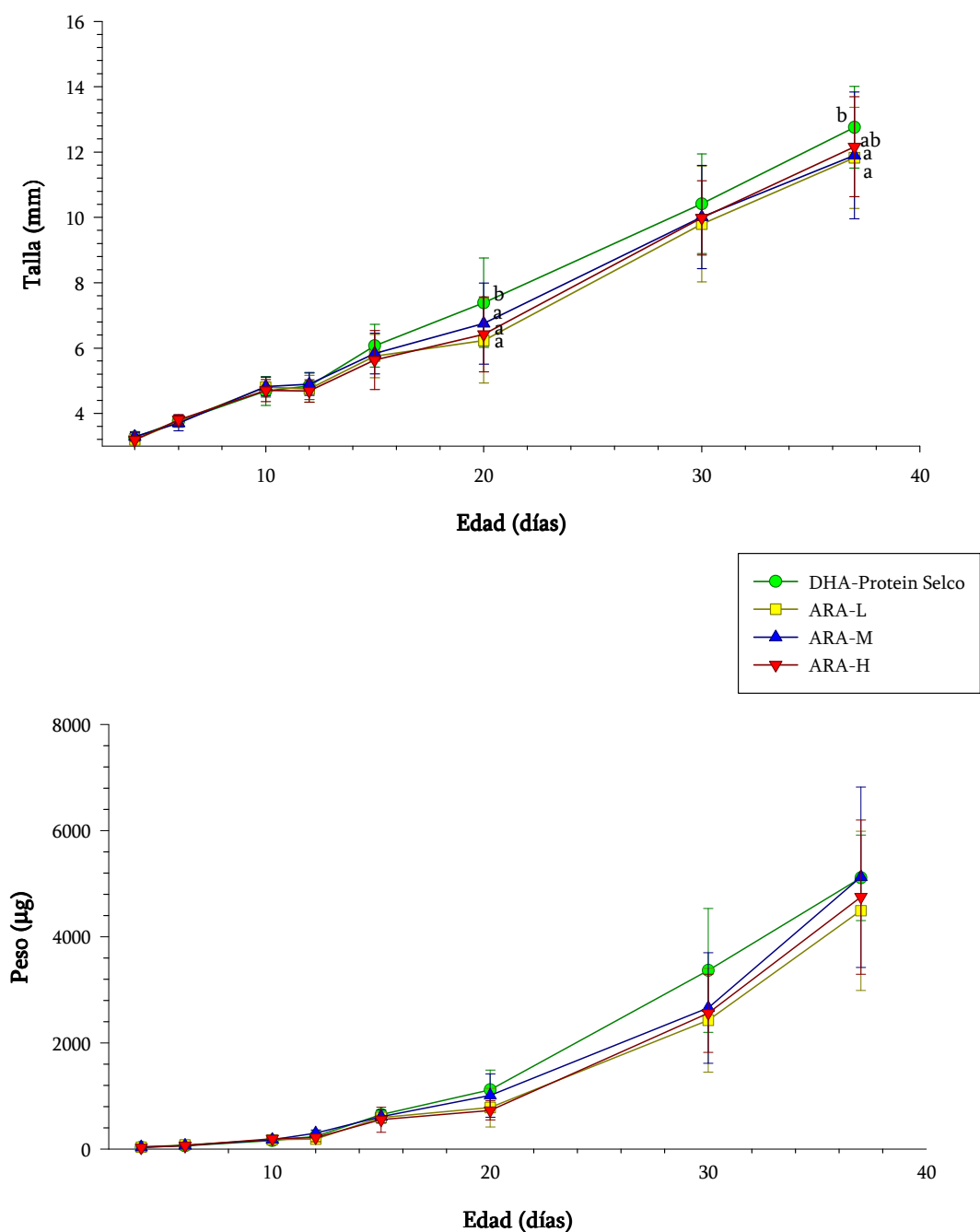


Figura 5.1. Cambios en talla y peso seco de las larvas del lenguado senegalés a lo largo del periodo de estudio (media±SD,  $n=3$ ). Los superíndices indican diferencias significativas ( $P < 0,05$ ) entre los distintos tratamientos.

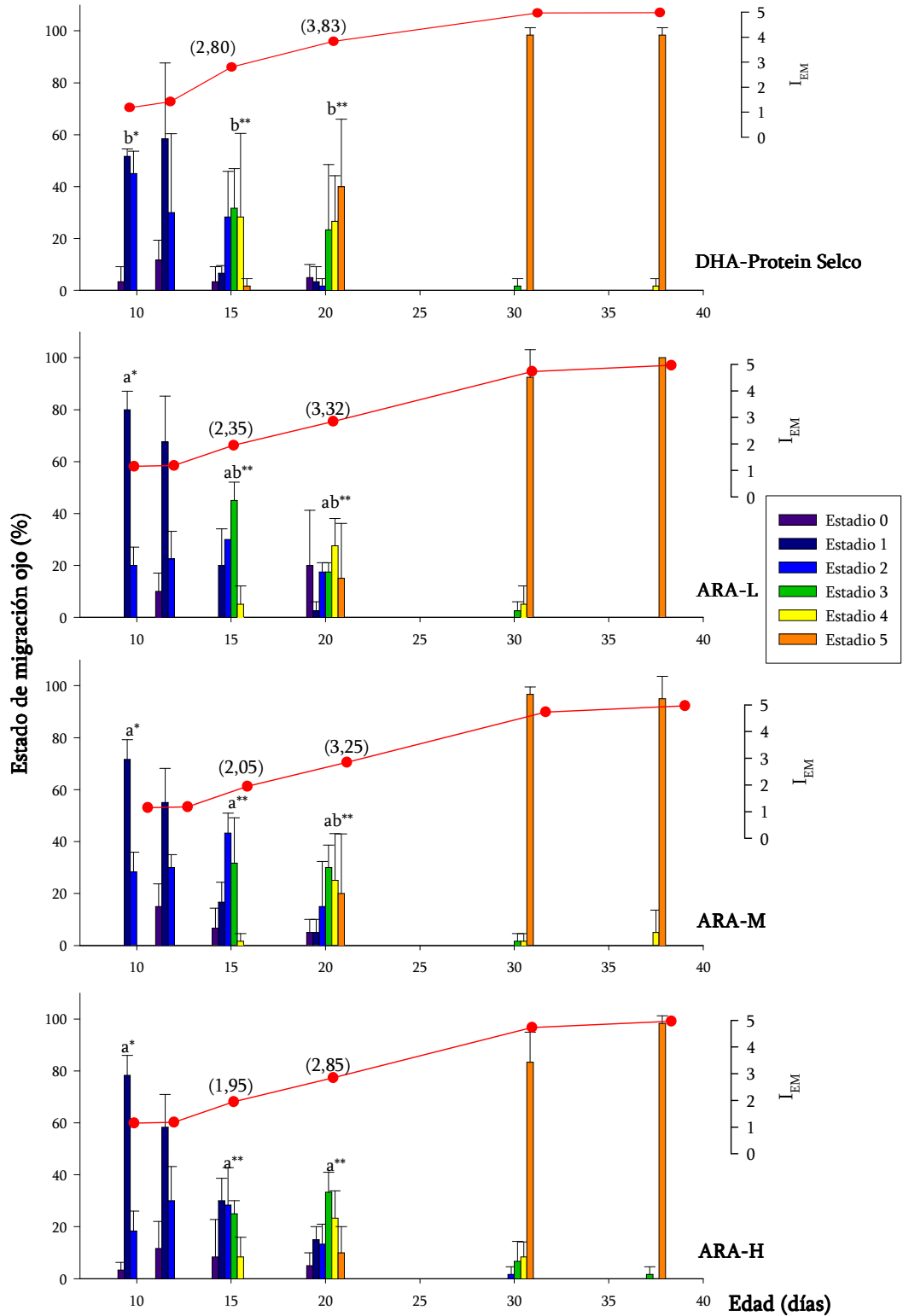


Figura 5.2. Proporciones de los distintos estadios de migración del ojo en los días de muestreo. Las barras verticales indican porcentaje±SD de larvas en cada uno de los estadios de migración. Los distintos superíndices marcan las diferencias significativas (\* $P<0,05$ , \*\* $P<0,001$ ) entre los distintos tratamientos para una misma edad. El  $I_{EM}$  se muestra como una línea por encima de las barra verticales, los valores entre paréntesis aparecen cuando se encontraron diferencias significativas ( $P<0,001$ ) entre los tratamientos para una misma edad.

	DHA-Protein Selco	ARA-L	ARA-M	ARA-H
Talla (mm)	12,8±1,2 <sup>b</sup>	11,8±1,6 <sup>a</sup>	11,9±1,9 <sup>a</sup>	12,2±1,5 <sup>ab</sup>
Peso seco (mg)	5,1±0,8	4,5±1,5	5,1±1,7	4,8±1,5
Supervivencia (%)	48,9±4,8	44,4±18,4	58,9±16,7	54,9±5,7
Pigmentación (%)	99,8±0,1 <sup>c</sup>	99,7±0,4 <sup>c</sup>	38,9±12,1 <sup>b</sup>	15,8±7,1 <sup>a</sup>

Tabla 5.3. Crecimiento, supervivencia y pigmentación de las larvas del lenguado senegalés al final del periodo de estudio (37 dph) (media±SD,  $n=3$ ).

Los superíndices indican diferencias significativas entre los grupos ( $P<0,05$ ,  $F_{3, 236}$  para talla,  $F_{3, 20}$  para peso seco (en inglés DW) y  $F_{3, 11}$  para supervivencia y pigmentación).

el grupo ARA-H el más retrasado ( $I_{EM}$  1,95 y 2,85, respectivamente). Al final del experimento, todos los grupos mostraron una metamorfosis completa y normal.

### 5.3.3. Efectos de la dieta sobre la composición de lípidos y ácidos grasos de los tejidos larvarios

Las larvas iniciales contenían elevadas proporciones de DHA, 16:0, OA, 18:0, ácido docosapentaenoico (22:5n-3, DPA) y EPA (24,2, 21,8, 8,8, 7,0, 4,1 y 3,9 %TFA, respectivamente, Tabla 5.2). El contenido en lípidos totales de la zona cefálica (incluidos cerebro y ojos), no se vio afectado por los tratamientos alimentarios (Tabla 5.4), mientras que el contenido en lípidos totales de los digestivos fue significativamente menor ( $P\leq 0,05$ , Tabla 5.5) en los grupos DHA-Protein Selco y ARA-H; las

	DHA-Protein Selco	ARA-L	ARA-M	ARA-H
Lípidos Totales (mg g <sup>-1</sup> ) (DW)	60,5±15,6	71,3±17,5	71,6±2,0	62,8±5,9
TFA (mg g <sup>-1</sup> ) (DW)	36,1±3,4	43,9±12,2	39,9±5,5	32,2±2,9
14:0	0,7±0,1	1,3±0,1	1,1±0,1	1,2±0,2
16:0	15,5±0,9	14,8±1,6	14,9±1,5	15,1±1,6
18:0	8,9±0,5	7,8±1,2	8,6±0,6	8,9±0,9
Total saturados	26,7±1,3	25,2±2,9	26,1±2,3	26,8±2,9
16:1n-7	3,3±0,3	0,3±0,1	1,6±1,4	1,0±0,9
18:1n-9	19,2±0,3 <sup>a,b</sup>	23,0±1,4 <sup>b</sup>	20,34±1,6 <sup>a,b</sup>	18,0±1,7 <sup>a</sup>
18:1n-7	6,8±0,1	6,1±0,4	5,4±0,5	5,3±0,4
20:1n-11	0,4±0,1	0,1±0,1	0,5±0,1	0,4±0,0
20:1n-9	0,4±0,1	0,1±0,1	0,2±0,0	0,1±0,1
Total monoinsaturados	32,1±1,7 <sup>a,b</sup>	34,6±1,4 <sup>a,b</sup>	36,9±2,5 <sup>b</sup>	29,5±1,6 <sup>a</sup>
18:2n-6	5,3±0,6	5,6±0,2	4,4±0,2	4,5±0,2
20:2n-6	0,2±0,0	0,2±0,0	0,2±0,0	0,2±0,0
20:3n-6	0,2±0,0	0,2±0,0	0,2±0,0	0,4±0,0
20:4n-6	3,6±0,5 <sup>a</sup>	2,8±0,5 <sup>a</sup>	5,6±0,1 <sup>b</sup>	7,9±0,5 <sup>c</sup>
Total PUFA n-6	10,8±1,4 <sup>a</sup>	9,0±0,7 <sup>a</sup>	11,2±0,1 <sup>a</sup>	14,7±0,5 <sup>b</sup>
18:3n-3	7,4±0,5	9,1±2,7	6,1±0,0	7,3±0,9
20:5n-3	3,6±0,3 <sup>b</sup>	2,5±0,3 <sup>a</sup>	1,6±0,1 <sup>a</sup>	1,8±0,3 <sup>a</sup>
22:5n-3	4,3±0,5 <sup>b</sup>	2,8±0,2 <sup>a</sup>	2,4±0,1 <sup>a</sup>	2,7±0,5 <sup>a</sup>
22:6n-3	13,0±0,4	14,7±1,1	16,1±1,9	15,4±1,4
Total PUFA n-3	30,3±1,8	31,1±3,7	27,7±2,0	29,0±3,1
DHA / EPA	3,6±0,2 <sup>a</sup>	5,9±0,7 <sup>b</sup>	10,0±0,9 <sup>c</sup>	8,7±0,7 <sup>c</sup>
ARA / DHA	0,3±0,03 <sup>a,b</sup>	0,2±0,03 <sup>a</sup>	0,4±0,05 <sup>b</sup>	0,5±0,06 <sup>b</sup>
ARA / EPA	1,0±0,1 <sup>a</sup>	1,1±0,05 <sup>a</sup>	3,5±0,1 <sup>b</sup>	4,5±0,6 <sup>b</sup>

Tabla 5.4. Composición en %TFA de los tejidos cefálicos (incluyendo ojos y cerebro) de las larvas del lenguado senegalés después de comer durante 37 día los nauplios enriquecidos con las emulsiones experimentales y la emulsión comercial (media±SD,  $n = 3$ ).

Los totales incluyen algunos componentes minoritarios que no se muestran.

Los superíndices (a, b, c) marcan las diferencias significativas entre los tratamientos ( $P < 0,05$ ,  $F_{3,11}$ ).



	DHA-Protein Selco	ARA-L	ARA-M	ARA-H
Lípidos Totales (mg g <sup>-1</sup> ) (DW)	76,7±19,5 <sup>a</sup>	118,6±15,6 <sup>b</sup>	116,5±13,4 <sup>b</sup>	70,9±18,1 <sup>a</sup>
TFA (mg g <sup>-1</sup> ) (DW)	34,3±5,0 <sup>a</sup>	74,5±9,1 <sup>b</sup>	50,39±12,6 <sup>b</sup>	37,6±3,8 <sup>a</sup>
14:0	0,8±0,2 <sup>a</sup>	1,8±0,1 <sup>b</sup>	1,6±0,5 <sup>a,b</sup>	1,7±0,2 <sup>a,b</sup>
16:0	14,9±0,8 <sup>b</sup>	12,2±0,3 <sup>a</sup>	14,6±1,2 <sup>a,b</sup>	13,7±0,7 <sup>a,b</sup>
18:0	9,5±0,2 <sup>b</sup>	6,0±0,2 <sup>b</sup>	8,8±1,5 <sup>b</sup>	7,7±0,6 <sup>a,b</sup>
Total saturados	27,2±0,9 <sup>b</sup>	21,6±0,5 <sup>a</sup>	26,8±2,5 <sup>b</sup>	24,8±1,6 <sup>a,b</sup>
16:1n-7	2,9±0,2	3,2±0,2	3,0±0,3	2,7±0,1
18:1n-9	20,5±2,6 <sup>a,b</sup>	26,3±1,4 <sup>b</sup>	21,5±1,9 <sup>a,b</sup>	20,3±0,9 <sup>a</sup>
18:1n-7	7,6±0,6	7,0±0,9	10,2±1,6	6,3±0,3
20:1n-11	0,7±0,1	0,7±0,1	0,7±0,1	0,5±0,0
20:1n-9	0,3±0,1	0,3±0,1	0,2±0,1	0,2±0,0
Total monoinsaturados	35,4±2,7	41,3±2,3	38,7±5,5	34,9±1,5
18:2n-6	5,7±0,2	6,2±0,3	5,3±0,3	5,5±0,5
20:2n-6	0,2±0,0	0,2±0,0	0,2±0,0	0,2±0,0
20:3n-6	0,2±0,1	0,1±0,0	0,2±0,1	0,5±0,0
20:4n-6	4,4±0,6 <sup>b</sup>	2,3±0,3 <sup>a</sup>	4,7±0,5 <sup>b</sup>	9,7±0,5 <sup>c</sup>
Total PUFA n-6	12,0±0,2 <sup>b</sup>	9,4±0,6 <sup>a</sup>	11,3±0,5 <sup>b</sup>	17,5±1,2 <sup>c</sup>
18:3n-3	9,6±0,8	10,8±1,0	8,4±1,1	9,0±1,0
20:5n-3	3,1±0,9	2,3±0,4	2,8±1,5	1,6±0,3
22:5n-3	3,0±0,8	2,3±0,4	2,3±0,9	2,0±0,3
22:6n-3	8,2±0,2	10,6±2,0	7,8±0,1	8,7±1,3
Total PUFA n-3	25,7±2,7	27,8±2,2	23,0±3,9	22,7±1,9
DHA / EPA	3,0±1,1	4,6±0,2	3,5±1,4	5,5±0,4
ARA / DHA	0,5±0,07 <sup>b</sup>	0,2±0,01 <sup>a</sup>	0,6±0,07 <sup>a,b</sup>	1,1±0,2 <sup>c</sup>
ARA / EPA	1,7±0,9 <sup>a,b</sup>	1,0±0,07 <sup>a</sup>	2,2±1,0 <sup>a,b</sup>	6,3±1,3 <sup>b</sup>

Tabla 5.5. Composición en %TFA de los digestivos (incluyendo hígado) de las larvas del lenguado senegalés después de comer durante 37 día los nauplios enriquecidos con las emulsiones experimentales y la emulsión comercial (media±SD,  $n = 3$ ).

Los totales incluyen algunos componentes minoritarios que no se muestran.

Los superíndices (a, b, c) marcan las diferencias significativas entre los tratamientos ( $P < 0,05$ ,  $F_{3,11}$ ).

	DHA-Protein Selco	ARA-L	ARA-M	ARA-H
Lípidos Totales (mg g <sup>-1</sup> ) (DW)	69,5±5,4 <sup>b</sup>	109,2±63,8 <sup>b</sup>	42,8±14,7 <sup>a</sup>	60,2±9,7 <sup>b</sup>
TFA (mg g <sup>-1</sup> ) (DW)	19,6±2,8 <sup>b</sup>	26,3±15,0 <sup>b</sup>	9,0±3,6 <sup>a</sup>	12,1±4,2 <sup>b</sup>
14:0	0,9±0,3	1,0±0,3	1,2±0,1	1,2±0,1
16:0	14,2±0,4	12,2±1,4	13,2±1,2	13,5±0,7
18:0	8,0±0,5	7,6±2,3	7,6±1,5	7,9±0,8
Total saturados	25,4±1,0	22,8±3,6	23,9±2,9	24,7±1,5
16:1n-7	4,1±0,2	4,2±0,9	4,1±0,3	3,8±0,3
18:1n-9	19,2±0,1 <sup>a</sup>	23,8±2,2 <sup>b</sup>	22,8±1,4 <sup>a,b</sup>	20,6±0,9 <sup>a,b</sup>
18:1n-7	7,9±0,1	4,9±3,2	6,9±0,2	6,7±0,5
20:1n-11	0,7±0,1	0,4±0,3	0,6±0,1	0,6±0,1
20:1n-9	0,2±0,1	0,4±0,3	0,2±0,1	0,2±0,0
Total monoinsaturados	37,3±1,2	42,3±3,6	39,8±2,4	37,8±2,8
18:2n-6	5,9±0,1	7,7±1,7	5,9±0,4	6,0±0,2
20:2n-6	0,4±0,2	1,2±0,9	0,6±0,7	0,2±0,0
20:3n-6	0,2±0,0	0,0±0,0	0,2±0,1	0,4±0,0
20:4n-6	3,3±0,1 <sup>b</sup>	1,3±0,8 <sup>a</sup>	5,2±0,4 <sup>c</sup>	7,6±0,7 <sup>d</sup>
Total PUFA n-6	10,8±0,1 <sup>a</sup>	11,2±2,1 <sup>a</sup>	12,2±0,9 <sup>a,b</sup>	15,3±0,6 <sup>b</sup>
18:3n-3	10,2±0,6	9,9±3,3	9,2±1,1	9,0±1,3
20:5n-3	4,0±0,1 <sup>c</sup>	2,6±0,1 <sup>b</sup>	2,2±0,3 <sup>a,b</sup>	1,7±0,3 <sup>a</sup>
22:5n-3	3,6±0,1 <sup>b</sup>	2,4±0,4 <sup>a</sup>	2,5±0,1 <sup>a</sup>	2,3±0,1 <sup>a</sup>
22:6n-3	6,9±0,3	8,7±1,4	8,6±1,1	7,7±1,2
Total PUFA n-3	26,6±0,8	25,4±2,2	24,2±2,7	22,3±2,4
DHA / EPA	1,7±0,1 <sup>a</sup>	3,3±0,5 <sup>b</sup>	4,0±0,3 <sup>b,c</sup>	4,6±0,3 <sup>c</sup>
ARA / DHA	0,5±0,01 <sup>b</sup>	0,2±0,1 <sup>a</sup>	0,6±0,06 <sup>b</sup>	1,0±0,07 <sup>c</sup>
ARA / EPA	0,8±0,02 <sup>a</sup>	0,5±0,3 <sup>a</sup>	2,5±0,4 <sup>b</sup>	4,6±0,4 <sup>c</sup>

Tabla 5.6. Composición en %TFA de las carcasas de las larvas del lenguado senegalés después de comer durante 37 día los nauplios enriquecidos con las emulsiones experimentales y la emulsión comercial (media±SD,  $n = 3$ ).

Los totales incluyen algunos componentes minoritarios que no se muestran.

Los superíndices (a, b, c, d) marcan las diferencias significativas entre los tratamientos ( $P < 0,05$ ,  $F_{3,11}$ ).

carcasas mostraron un contenido significativamente menor ( $P \leq 0,05$ , Tabla 5.6) de lípidos totales en el grupo ARA-M. Los lípidos de los digestivos y las carcasas estaban compuestos principalmente por MUFA (35 - 41% y 37 - 42% TFA, respectivamente, Tablas 5.5 y 5.6), mientras que la proporción más elevada de PUFA se encontró en los lípidos de la zona cefálica (39-44% TFA, Tabla 5.4). Después de 37 días de alimentación con nauplios de *Artemia* enriquecidos en las emulsiones experimentales o en la emulsión comercial, la composición en ácidos grasos de los distintos tejidos larvarios reflejaba la composición en ácidos grasos de las emulsiones, siendo los MUFA y PUFA los que mostraron mayores diferencias, especialmente en el tejido cefálico. Los SFA fueron relativamente constantes, aproximadamente un 25% TFA, en todos los tejidos examinados. El aumento de ARA en las dietas provocó un aumento significativo de este ácido graso ( $P \leq 0,0001$ ) y del total de PUFA n-6 ( $P \leq 0,05$ ) en los tres tipos de tejidos analizados. Las proporciones de DHA fueron mayores en el tejido cefálico (13,0-16,1% TFA) y las proporciones de EPA en todos los tejidos fueron inversa y significativamente proporcionales a la concentración de ARA en el alimento ( $P=0,011$ ,  $r^2=0,528$  para el tejido cefálico,  $P=0,019$ ,  $r^2=0,519$  para las carcasas y  $P=0,06$ ,  $r^2=0,304$  para digestivos).

Los niveles de ácidos grasos en la dieta afectaron a su retención en los tejidos larvarios (Figura 5.3). Todas las larvas mostraron unos niveles relativos de OA menores en sus tejidos que en la dieta, mientras que los PUFA, y especialmente el DHA, EPA y DPA, se encontraron en mayores proporciones en los tejidos que en las dietas. Las larvas alimentadas con *Artemia* enriquecida con las emulsiones ARA-L y DHA-Protein Selco mostraron niveles de ARA mayores en sus tejidos que en el alimento. Se encontraron regresiones lineares

significativas entre los contenidos totales de ARA en la dieta y el contenido de ARA en el tejido cefálico (ARA=14,02±1,64 ARA dieta,  $P=0,002$ ,  $r^2=0,726$ ), el contenido en ARA del digestivo (ARA=81,72±0,43 ARA dieta,  $P=0,07$ ,  $r^2=0,63$ ), y el contenido de ARA en las carcasas (ARA=10,20±1,25 ARA dieta,  $P=0,009$ ,  $r^2=0,349$ ).

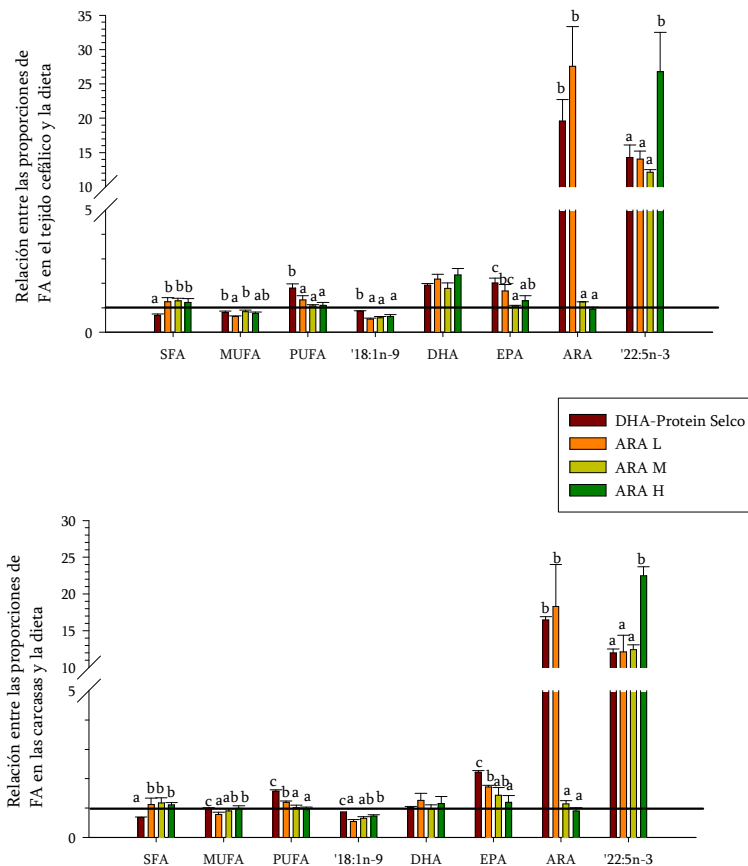


Figura 5.3. Proporciones relativas entre los ácidos grasos (en inglés FA) de la región cefálica (gráfico superior) o de la carcasa (gráfico inferior) de las larvas con respecto a los ácidos grasos de la *Artemia* enriquecida en cada una de las emulsiones utilizadas (media±SD,  $n=3$ ).

La barra horizontal indica el punto en que las proporciones de ácidos grasos de los tejidos y de la dieta son idénticas. Valores por encima de este punto indican que hay una mayor proporción del ácido graso en el tejido que en la dieta y viceversa.

Los superíndices indican diferencias significativas ( $P<0,05$ ) entre los distintos tratamientos.

#### **5.3.4. Efectos de la dieta sobre la pigmentación**

Se encontraron diferencias significativas ( $P < 0,0001$ ,  $F_{3,11}$ , Tabla 5.3) en el grado de pigmentación, con un 100% de individuos pigmentados en los grupos DHA-Protein Selco y ARA-L, y proporciones significativamente mayores de individuos malpigmentados en los grupos ARA-M y ARA-H. Se encontró una regresión lineal significativa entre el contenido de ARA en la región cefálica y el grado de pigmentación (Pigmentación =  $149,23 - 3,12 \text{ ARA}$ ,  $P = 0,0012$ ,  $r^2 = 0,706$ ), mientras que para el EPA la regresión fue más débil y positiva (Pigmentación =  $-1,14 + 4,56 \text{ EPA}$ ,  $P = 0,0097$ ,  $r^2 = 0,543$ ). Así, se pudo establecer una clara relación entre el contenido en la dieta de ARA, la acumulación de ARA observada en los tejidos y relacionada con el desplazamiento del EPA, y el grado de pigmentación de las larvas del lenguado senegalés. Como consecuencia, las relaciones en las que está implicado el ARA mostraron una correlación con el grado de pigmentación (Figura 5.4).

#### **5.4. Discusión**

Este capítulo es uno de los primeros estudios en examinar el efecto de los ácidos grasos de la dieta sobre el desarrollo de la larva del lenguado senegalés, usando un diseño dosis-respuesta. La supervivencia y el crecimiento no se vieron afectados por el contenido en ARA de la dieta, incluso a elevadas concentraciones (más del 8% TFA,  $40,53 \text{ mg g}^{-1}$  de los lípidos totales). Otros autores también han demostrado que durante el desarrollo larvario de distintas especies de peces planos (*P. dentatus* (Willey et al., 2003), *L. ferruginea*

(Copeman et al., 2002), *S. maximus* (Estévez et al., 1999) y *H. hippoglossus* (McEvoy et al., 1998a)) se puede suministrar ARA a elevadas concentraciones sin ningún efecto sobre el crecimiento o la supervivencia.

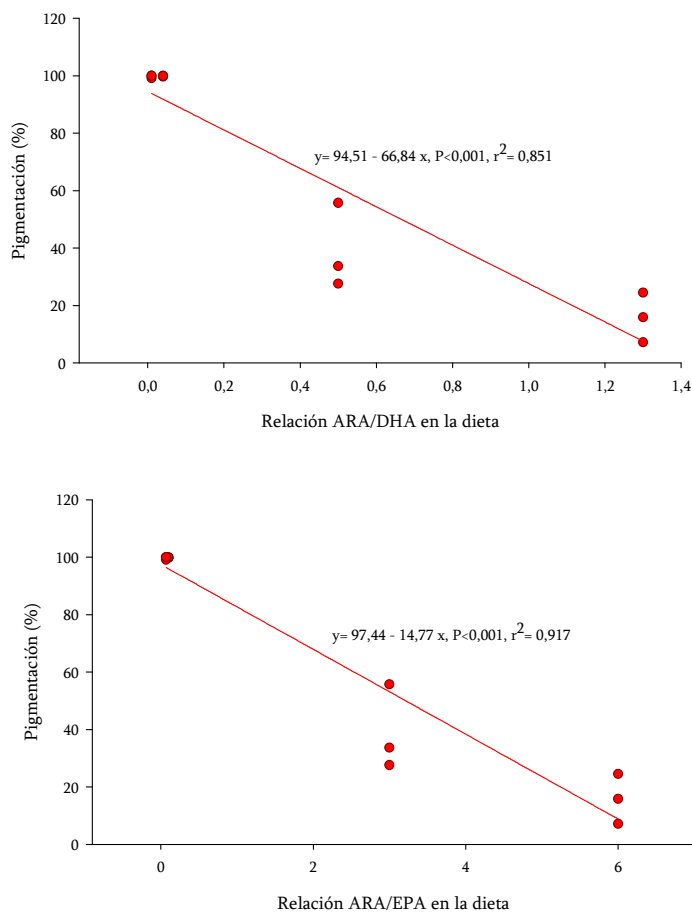


Figura 5.4. Correspondencias entre las relaciones ARA/DHA y ARA/EPA presentes en la dieta y el porcentaje de individuos pigmentados al finalizar el experimento. Las regresiones lineales se muestran junto a la representación de las réplicas ( $n=9$ ).

La emulsión DHA-Protein Selco contiene componentes nutricionales no presentes en las emulsiones experimentales, como pueden ser las proteínas y las vitaminas. Como consecuencia, las larvas alimentadas con los nauplios

enriquecidos con la emulsión comercial fueron ligeramente mayores en tamaño, y por lo tanto, mostraron una metamorfosis avanzada (Figura 5.2). Este hecho fue particularmente evidente entre los días 15 y 20 después de la eclosión, cuando se dan los fenómenos más evidentes de la metamorfosis. Las larvas con crecimiento más rápido generalmente metamorfosean más rápidamente que aquellas con un crecimiento menor (Naess y Lie, 1998), y estas a su vez son las que presentan mayor mortalidad al final del periodo de transformación (Christensen y Korsgaard, 1999). Sin embargo, al final del experimento no se encontraron diferencias en las supervivencias de los distintos grupos, por lo que se deduce que las pequeñas diferencias de crecimiento no son importantes para la supervivencia de esta especie.

El aumento en el contenido de ARA en la dieta provocó retrasos en los procesos metamórficos. Las larvas del grupo ARA-L mostraron los mayores índices de migración del ojo en los días 15 y 20 después de la eclosión, seguidas de las larvas del grupo ARA-M, mientras que las larvas del grupo ARA-H mostraron los menores índices de migración. Como el crecimiento no estuvo relacionado con el contenido en ARA de la dieta, la causa de estas diferencias debió de ser algún otro mecanismo. Estos hechos sugieren que, aunque los mecanismos bioquímicos exactos causantes de estas diferencias aún no están bien estudiados, tanto el ARA como sus derivados han de estar relacionados directamente con el proceso metamórfico de los peces planos.

Las larvas de un día contenían elevadas proporciones de DHA, 16:0, OA, 18:0 y DPA, los mismos resultados se han obtenido en análisis de otras larvas de peces marinos (Izquierdo, 1996). Vazquez et al. (1994) y Mourente y Vazquez (1996) obtuvieron resultados similares en cuanto a composición en ácidos grasos

en las larvas de lenguado de un día, tanto para los valores relativos como absolutos. La composición en ácidos grasos de las larvas reflejó la composición de sus dietas, lo que es afín con los resultados obtenidos en otros estudios sobre larvas de peces (Mourente et al., 1993; Harel et al., 2000; Koven et al., 2001; Bransden et al., 2004). En los tejidos de la zona cefálica de la larva, la acumulación de ARA fue proporcional al contenido de la dieta, hasta un nivel máximo de 40 mg g<sup>-1</sup> de lípido. Los efectos de la dieta sobre la composición de los tejidos fueron más evidentes en la zona cefálica y en los digestivos que en las carcasas de las larvas, resultados que se observaron también en *S. maximus* (Estévez et al., 1999). El contenido en DHA del tejido cefálico fue más de un 50% superior al contenido de este mismo ácido graso en los otros tejidos analizados, mostrando así su función esencial en los tejidos neurales y visuales (Mourente et al., 1991; Bell et al., 1995b). El aumento de DHA en la dieta no provocó cambios en la composición de DHA de los tejidos, efecto contrario al observado por Harel et al. (2000) en las larvas de *M. chrysops*. Por otro lado, el contenido en EPA de todos los tejidos analizados se vio significativamente reducido al aumentar la ingesta de ARA, esta reducción fue más elevada en los lípidos del tejido cefálico y del digestivo que en los de la carcasa. Efectos similares de la ingesta de ARA sobre el contenido de EPA en los tejidos se han observado en larvas de otras especies de peces marinos (Estévez et al., 1999; Willey et al., 2003) y de agua dulce (Harel et al., 2000), y han sido atribuidos a la interacción competitiva entre estos dos ácidos grasos (Tocher y Sargent, 1986; Bell et al., 1995a). Harel et al., (2000) usaron regresiones lineales entre los distintos ácidos grasos y el contenido de ARA en los tejidos, para calcular la tasa de desplazamiento o retención de cada uno de ellos. Usando este método, en



este estudio solo se pudieron obtener regresiones significativas entre los contenidos de ARA y EPA del tejido digestivo. En este caso el grado de desplazamiento fue de  $0,147 \pm 0,073$  mg de EPA por mg de ARA ( $r^2=0,286$ ,  $P=0,07$ ). A excepción de la reducción de EPA en los tejidos al aumentar la cantidad de ARA, no se pudieron observar otras relaciones de competencia entre los ácidos grasos de los tejidos de las larvas del lenguado senegalés.

Las larvas alimentadas con DHA-Protein Selco y ARA-L mostraron una elevada retención de ARA en sus tejidos, lo que es debido a que en estas dietas el ARA solo está presente en 0,1-0,2%, en cambio el contenido inicial de este ácido graso en las larvas recién eclosionadas es del 2,9%. A mayor suministro de ARA por medio de la dieta, la retención de este ácido graso en los tejidos se ve significativamente reducida. El contenido en DHA fue similar en todas las dietas y en todos los tejidos analizados, si bien las proporciones iniciales de DHA en las larvas (24,2% TFA) fueron tres veces mayores que las encontradas en las larvas de todos los grupos a los 37 días (aproximadamente 8% TFA). Sargent et al. (1999b) propusieron que los requerimientos en ácidos grasos se podían establecer examinando las proporciones de estos en los huevos. Aunque la composición de los huevos no se estudió en este trabajo, el contenido de DHA (24,2% TFA) encontrado en las larvas recién eclosionadas es substancialmente mayor que la proporción de DHA que se suministró en las dietas (7,3% TFA). Esto indica que probablemente el DHA no se suministró en cantidades suficientes. Es un hecho interesante que el DPA, suministrado a menos de un 0,3% TFA en las dietas, se encontró a niveles cien veces superiores en los tejidos analizados. Debido a una limitada expresión de los genes elongasa y desaturasa, los peces marinos tienen una reducida capacidad de convertir el LNA a PUFA n-

3 de cadena más larga (Sargent et al., 2002; Tocher, 2003). Por otro lado, hay especies que, aunque a bajos niveles, son capaces de convertir el EPA en DHA (Sargent et al., 1989, 1995). Los enzimas elongasa facilitan la conversión de EPA a DPA muy rápidamente. Sin embargo, la conversión de DPA a DHA es mucho más compleja, ya que es necesario de una elongación, una desaturación y un acortamiento de la cadena, haciendo de este paso un proceso limitante. Como consecuencia, los peces marinos que ingieren una cantidad inadecuada de DHA son incapaces de alongar y desaturar completamente el EPA a DHA suficientemente rápido como para responder a los requerimientos, y por lo tanto, el producto intermedio, DPA, se acumula. Este hecho ha sido apoyado por distintos estudios en larvas de peces marinos (Izquierdo et al., 1992; Bell et al., 1995b; Bransden et al., 2004). La acumulación de DPA observada en este capítulo es consistente con el hecho de que el suministro alimentario de DHA fue inferior al requerido por las larvas del lenguado senegalés y, como en otras especies de peces marinos, el lenguado senegalés tiene una capacidad limitada de convertir completamente el EPA a DHA. La concentración de DHA fue la misma para todos los tratamientos, por lo tanto, el hecho de haber suministrado concentraciones por debajo del requerimiento de las larvas no tuvo porque enmascarar o cambiar los efectos debidos a las distintas dosis de ARA. No obstante, en este punto nos planteamos la posibilidad de realizar un estudio para determinar los requerimientos en DHA de las larvas del lenguado senegalés.

Como otros autores ya han indicado (McEvoy et al., 1998a; Estévez et al., 1999; Copeman et al., 2002), hay una clara relación entre el contenido en la dieta de ARA, la acumulación de ARA en los tejidos de la larva y el grado de pigmentación de las larvas. Willey et al. (2003) suministraron rotíferos y

*Artemia* enriquecidos en ARA a larvas de *P. dentatus* y encontraron que al aumentar el ARA de la dieta aumentaba el índice de individuos malpigmentados (Willey, comunicación personal). En el presente estudio, se encontró una correspondencia entre las relaciones ARA/EPA ( $r^2=0,917$ ,  $P<0,0001$ ) y ARA/DHA ( $r^2=0,851$ ,  $P<0,0001$ ) y el grado de pigmentación (Figura 5.4). Resultados de otros experimentos nutricionales con distintas larvas de peces planos también indican que la relación ARA/EPA de la dieta tiene importancia sobre el grado de pigmentación (Tabla 5.7). Sin embargo, la relación DHA/EPA ( $r^2=0,509$ ,  $P>0,1$ ), que según otros autores mostró un efecto positivo sobre el grado de pigmentación de peces planos (Reitan et al., 1994), no mostró ninguna correlación en el presente estudio. Cada vez se está haciendo más evidente que el DHA de la dieta probablemente no sea un factor determinante para la pigmentación de los peces planos. Por ejemplo, Seikai et al. (1987) alimentaron a larvas de *P. olivaceus* con nauplios de *Artemia* exentos de DHA y al final del experimento más del 76% de los individuos presentaron una pigmentación normal. Copeman et al. (2002) alimentaron a larvas de *L. ferruginea* con rotíferos que contenían solo un 1,7% de DHA en su composición y como consecuencia obtuvieron una de las tasas de pigmentación (46%) más elevadas de todo el estudio (Tabla 5.7).

El mecanismo exacto por el cual el ARA causa malpigmentación en peces planos aún se desconoce, pero se han postulado diversas hipótesis. La primera, es que la alteración del contenido de ARA en la dieta provoca una composición bioquímica sub-óptima de las membranas de los tejidos neurales y como consecuencia el control de la metamorfosis, la síntesis de melanina y la diferenciación de los cromatóforos se alteran (Estévez et al., 1999). La segunda,

es que un exceso de producción de eicosanoides derivados del ARA induce a un estrés bioquímico en el pez (Sargent et al., 1999b). Y la tercera, es que la síntesis y degradación de las tirosinasas, que son necesarias en la regulación de la pigmentación, pueden ser modificadas por el contenido de PUFA n-6 de la dieta (Ando et al., 2004). Estévez et al. (2001) encontraron que individuos de *P. olivaceus* inducidos a la malpigmentación debido al contenido de ARA en la dieta, producían la misma cantidad de melanocortinas ( $\alpha$ -hormona estimulante de los melanocitos ( $\alpha$ -MSH) y adrenocorticotropina (ACTH)), las cuales son importantes en el proceso de la pigmentación, comparado con individuos normalmente pigmentados, con lo cual, posiblemente se anularía la primera hipótesis, aunque sería necesario validar el trabajo con otras especies de peces planos. En el presente capítulo no se cuantificó la producción de eicosanoides, sin embargo existen estudios en larvas de *L. lineata* y de *G. morhua* que relacionan, mediante diseños dosis-respuesta, el contenido de ARA en la dieta (usando formulaciones e ingredientes parecidos a los de este capítulo) con las concentraciones de PGE<sub>2</sub> (Bransden et al., 2005c, 2005d). La PGE<sub>2</sub> puede estar ligada a la respuesta al estrés en los peces mediante la modulación de la liberación de cortisol (Gupta et al., 1985; Koven et al., 2003), mientras que Sargent et al. (1999b) también supusieron que la malpigmentación podría estar causada por un estrés bioquímico, en este mismo sentido, la PGE<sub>2</sub> también ha sido relacionada con la  $\alpha$ -MSH (Naveh et al., 2000). Así, al unir los resultados de todos estos trabajos se sugiere una influencia del contenido de ARA en la dieta sobre la síntesis de PGE<sub>2</sub>, la cual a su vez puede afectar a la pigmentación de las larvas del lenguado senegalés. No obstante, sería necesario realizar más estudios para validar este punto.

DHA dieta (%)	ARA dieta (%)	ARA/EPA dieta	Pigmentación (%)	Especie	Referencia
6,8	0,2	0,11	100	<i>S. senegalensis</i>	Presente capítulo
6,8	0,1	0,07	100		
8,9	4,5	3,0	39		
6,6	8,3	5,93	16		
6,5	1,0	0,12	56	<i>S. maximus</i>	Estévez y Kanazawa (1995)
1,3	0,6	0,18	27		
0,0	0,0	0,0	0		
3,5	1,0	0,03	82	<i>S. maximus</i>	Estévez et al. (1999)
3,0	1,2	0,1	86		
10,0	1,8	0,24	86		
9,9	2,5	0,33	79		
8,9	4,8	0,69	33		
6,9	7,9	1,44	1		
21,8	1,8	0,17	40	<i>H. hippoglossus</i>	Shields et al. (1999)
5,1	1,5	0,28	3,5		
39,4	0,3	0,03	99	<i>H. hippoglossus</i>	McEvoy et al. (1998b)
5,2	1,5	0,12	66		
32,9	0,8	0,02	100	<i>H. hippoglossus</i>	Naess et al. (1995)
5,0	1,7	0,17	29		
0,2	2,3	0,64	4		
0,0	1,4	0,15	17	<i>P. olivaceus</i>	Seikai et al. (1987)
0,0	0,8	0,33	76		
0,0	4,3	0,7	0		
0,4	1,6	0,11	11	<i>P. olivaceus</i>	Yamamoto et al. (1992)
13,3	0,8	0,12	88		
0,4	2,0	0,13	11		
6,9	0,6	0,06	63	<i>P. platessa</i>	Dickey-Collas y Geffen (1992)
0,0	0,5	0,26	29		
21,5	2,2	0,2	39	<i>L. ferruginea</i>	Copeman et al. (2002)
1,7	0,7	0,28	46		
28,2	1,2	0,34	47		
23,4	7,1	2,21	8		

Tabla 5.7. Contenido de DHA (%TFA) y EPA/ARA en la dieta (rotífero, *Artemia* o zooplankton, dependiendo de la especie) y pigmentación obtenida en diferentes especies de peces planos de acuerdo con la literatura existente.

Solo se mencionan las referencias en las que se muestra el contenido en ácidos grasos de la dieta.

En estudios recientes, Ando et al. (1999, 2004), un cultivo de células de melanoma de ratón en un medio enriquecido en LA (25  $\mu$ M), mostró una reducción del 30% del contenido en melanina y un 50% de reducción en el contenido de tirosinasa, uno de los enzimas que intervienen en la síntesis de melanina. La administración por vía tópica de LA se ha usado en humanos para prevenir los desordenes hiperpigmentarios, así como el melasma (Lee et al., 2002) y la pigmentación inducida por los rayos ultra violeta (Ando et al., 1998). Ando et al. (2004) observaron que el LA acelera la degradación espontánea de la tirosinasa. Para regular la pigmentación es necesario un balance adecuado entre la síntesis y la degradación de la tirosinasa, este punto es de particular interés en el presente capítulo. De hecho, otros estudios que usaron concentraciones bajas de ARA obtuvieron efectos similares sobre la tirosinasa (Ando et al., comunicación personal, 2004).

En esencia, hasta el día 37 de cultivo el contenido en ARA de la dieta no afectó ni al crecimiento ni a la supervivencia de las larvas del lenguado senegalés. Una emulsión comercial produjo los mejores resultados de crecimiento, lo que probablemente influyó en que la metamorfosis de estos individuos siempre se mantuviera en estadios más avanzados al compararla con la de los otros grupos experimentales, aunque este hecho no mejoró la tasa de supervivencia. Al aumentar el contenido de ARA en la dieta, la metamorfosis se retrasó durante los estadios más críticos, indicando así, la importancia de este ácido graso y sus derivados en la metamorfosis de los peces planos. La composición en ácidos grasos de los tejidos de las larvas, generalmente reflejaron la composición de la dieta, a excepción de la relación de competencia entre el contenido de ARA en la dieta y el contenido de EPA en los tejidos. Los PUFA

fueron fuertemente retenidos en los tejidos. Se observó un aumento de como mínimo 100 veces en la proporción del DPA contenido en los tejidos, al compararlo con el contenido de DPA en la dieta, lo que puede indicar una elongación de cadena desde el EPA como resultado de un aporte inadecuado de DHA. Como en otros estudios en peces planos marinos, se detectó una fuerte correspondencia entre la relación ARA/EPA de la dieta y la pigmentación. El mecanismo exacto por el cual el ARA induce a la malpigmentación en peces planos aún se desconoce, aunque parece ser un efecto de la excesiva producción de eicosanoides o una inadecuada regulación de la tirosinasa.





*6. CAPÍTULO III: Distintas  
concentraciones de DHA en la dieta  
provocan efectos en el crecimiento, en  
la supervivencia y en el perfil de ácidos  
grasos de los tejidos de las larvas del  
lenguado senegalés*



## **6.1. Introducción**

El DHA, junto con el ARA y el EPA, son considerados como ácidos grasos esenciales para los peces marinos. Las presas vivas, tanto el rotífero como la *Artemia*, son deficitarias en estos ácidos grasos (Sargent et al., 1999b) y por lo tanto han de pasar por un periodo de enriquecimiento. Una deficiencia en EFA puede provocar retrasos en el crecimiento, problemas patológicos y elevada mortalidad (Sargent et al., 1995). Sin embargo, son pocos los estudios que han abordado el estudio de estos efectos sobre la larva del lenguado senegalés. Morais et al. (2004b) usaron distintos tipos de enriquecimiento de *Artemia*, pero no pudieron demostrar ningún efecto claro de los PUFA sobre el crecimiento o la supervivencia de las larvas. No obstante, puede que la ingesta adecuada de PUFA durante los primeros estadios de desarrollo pueda seguir teniendo efecto sobre el crecimiento y la supervivencia durante los estadios más tardíos (Howell et al., 1995). En el capítulo anterior se demostró que la ingesta de ARA es importante en el control de la pigmentación de las larvas de lenguado senegalés (Villalta et al., 2005a). El requerimiento de PUFA n-3 por parte de las larvas del lenguado senegalés no ha sido evaluado, pero durante el estudio de los requerimientos de ARA, se acumuló DPA en los tejidos de las larvas. De la elongación del EPA se obtiene DPA, paso que ocurre rápidamente en peces. Desde el DPA se obtiene DHA, para que esto ocurra es necesario de una elongación, una desaturación y un acortamiento de cadena, pasos que son mucho más complejos y por tanto ocurren en bajas tasas, es decir, de este modo no se puede obtener la cantidad necesaria de DHA para satisfacer los requerimientos de los peces (Sargent et al., 1995, 1999b). La acumulación de

DPA se ha observado en otros estudios donde no se suministró una adecuada cantidad de DHA a las larvas de peces marinos (Izquierdo et al., 1992; Bell et al., 1995b; Bransden et al., 2004), este hecho puede ser indicativo de que la concentración de DHA suministrada en el capítulo anterior (1,5 – 3,3 mg DHA g DW<sup>-1</sup>) fue inferior a los requerimientos necesarios de la larva del lenguado senegalés. Así, este capítulo se diseñó para investigar el efecto del DHA presente en la dieta. Se usaron concentraciones inferiores y superiores a las del capítulo anterior, y se observó el efecto sobre el crecimiento y la supervivencia de las larvas del lenguado senegalés desde el día 1 al día 36 después de la eclosión, usando un diseño dosis-respuesta.

## **6.2. Material y métodos**

### **6.2.1. Emulsiones experimentales**

Se usaron aceites ricos en DHA (Neuromins<sup>®</sup>, Martek Bioscience, USA), y en ARA (Vevodar<sup>®</sup>, DSM Food specialties, Holanda). El aceite Neuromins<sup>®</sup> fue gradualmente reemplazado por aceite de oliva para producir emulsiones con nulo (DHA-N), bajo (DHA-L), medio (DHA-M) y alto (DHA-H) contenido en DHA. Los componentes que se utilizaron en la formulación de cada emulsión y la composición en ácidos grasos de los nauplios de *Artemia* enriquecidos resultante se muestran en la Tabla 6.1. Las emulsiones de aceite fueron emulsionadas con cantidades iguales de agua destilada y homogenizadas con un Ultra-Turrax T25 a elevada velocidad durante 60 s. Se almacenaron en jeringas de plástico a 4 °C, procurando que no quedara en su interior aire residual.

	DHA-N	DHA-L	DHA-M	DHA-H
<b>Formulación (mg g<sup>-1</sup>)</b>				
Neuromins <sup>®</sup>	0	252	504	757
Vevodar <sup>®</sup>	50	50	50	50
Aceite vegetal <sup>a</sup>	0	35	69	103
Aceite de oliva <sup>b</sup>	860	573	287	0
Suplementos <sup>c</sup>	90	90	90	90
Lípidos Totales (mg g <sup>-1</sup> ) (DW)	50,3±4,0	50,2±5,3	48,6±6,2	43,5±7,5
TFA (mg g <sup>-1</sup> ) (DW)	31,7±3,5	34,5±6,0	31,8±2,8	32,3±6,3
<b>Ácidos grasos</b>				
14:0	0,5±0,1 <sup>a</sup>	1,7±0,1 <sup>b</sup>	2,9±0,4 <sup>c</sup>	4,9±2,1 <sup>d</sup>
16:0	11,5±1,7	11,8±1,1	13,0±0,3	14,5±0,8
18:0	5,3±0,1 <sup>b</sup>	4,6±0,1 <sup>a</sup>	4,9±0,1 <sup>a,b</sup>	5,2±0,3 <sup>b</sup>
Total saturados	18,0±1,7	18,5±1,3	21,6±0,5	25,5±3,6
16:1n-7	2,4±0,4	2,2±0,3	2,3±0,4	2,5±0,4
18:1n-9	36,4±8,1 <sup>b,c</sup>	38,1±7,0 <sup>b</sup>	29,4±5,4 <sup>a,b,c</sup>	22,4±3,0 <sup>a</sup>
20:1n-9	0,5±0,1	0,5±0,1	0,4±0,1	0,3±0,0
Total monoinsaturados	47,1±7,2 <sup>b</sup>	47,3±5,9 <sup>b</sup>	38,5±4,2 <sup>a,b</sup>	31,3±1,1 <sup>a</sup>
18:2n-6	6,9±0,5	7,3±0,4	7,7±0,6	8,4±1,2
20:2n-6	0,2±0,0	0,1±0,1	0,1±0,1	0,1±0,1
20:3n-6	0,1±0,1	0,1±0,1	0,2±0,1	0,8±0,2
20:4n-6	1,3±0,4	1,6±0,3	1,5±0,4	1,4±0,1
Total PUFA n-6	9,0±0,4	9,4±0,6	9,9±0,5	11,2±0,1
18:3n-3	20,2±3,7	15,7±4,0	17,3±5,4	16,4±7,9
20:5n-3	1,7±0,2	1,6±0,1	1,7±0,0	1,7±0,4
22:5n-3	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,1±0,0
22:6n-3	0,0±0,0 <sup>b</sup>	4,4±1,0 <sup>b</sup>	7,7±2,7 <sup>a,b</sup>	14,7±1,2 <sup>a</sup>
Total PUFA n-3	25,8±5,0	24,8±4,2	30,0±4,2	32,1±4,9
Total PUFA	34,9±5,4 <sup>a</sup>	34,1±4,7 <sup>a</sup>	39,9±4,7 <sup>a</sup>	43,2±4,7 <sup>a</sup>
n-3 / n-6	2,6±0,7	2,4±0,5	2,9±0,4	2,5±0,8
DHA / EPA	0,0±0,0 <sup>a</sup>	2,9±0,5 <sup>a</sup>	4,5±1,6 <sup>a,b</sup>	10,5±0,1 <sup>b</sup>
EPA/ARA	1,3±0,2	1,0±0,1	1,1±0,2	1,2±0,2

Tabla 6.1. Formulación de las emulsiones experimentales (mg g<sup>-1</sup>) y composición en %TFA de la *Artemia* tras el enriquecimiento (media±SD, n=3).

Los totales incluyen algunos componentes no mostrados.

<sup>a</sup> Mezcla de aceite de canola y semilla de soja.

<sup>b</sup> Procedente de olivas Lakelans (NSW, Australia)

<sup>c</sup> Suplementos: lecitina de soja, 70 mg; vitamina E, 20 mg

### **6.2.2. Enriquecimiento de las presas vivas**

Los rotíferos se enriquecieron durante 12 h a 20 °C, en tanques de 10 l a una densidad de 500 rotíferos ml<sup>-1</sup>, usando una concentración de cada una de las emulsiones de 0,1 g l<sup>-1</sup>. Antes de ser suministrados a las larvas, los rotíferos fueron lavados con abundante agua de mar y agua dulce.

Para el enriquecimiento se utilizó *Artemia* (cepa EG, INVE) eclosionada 6 h antes. Se enriqueció en tanques de 10 l durante 18 h a 26 °C, a una densidad de 100 nauplios ml<sup>-1</sup> y con una concentración de la emulsión de 0,6 g l<sup>-1</sup>. Los nauplios también fueron lavados con agua de mar y agua dulce antes de ser suministrados a las larvas.

Para el análisis de lípidos, tanto los nauplios de *Artemia* como los rotíferos se muestrearon dos veces durante el periodo de estudio.

### **6.2.3. Cultivo larvario**

Los huevos del lenguado senegalés se obtuvieron de reproductores mantenidos en cautividad en las instalaciones del IFAPA “El Toruño” (Pto. de Sta. María, Cádiz). Las puestas se obtuvieron bajo condiciones naturales de foto y termoperiodo. Los huevos fertilizados se transportaron al CA-IRTA y las larvas eclosionaron durante el trayecto. Una vez en las instalaciones donde se llevó a cabo el experimento, las larvas fueron distribuidas en 12 tanques de malla (150 µm de poro) a una densidad de 50 larvas l<sup>-1</sup>. Los doce tanques se distribuyeron en cuatro tanques mayores de 1500 l (a razón de 3 en cada uno), que estuvieron conectados a una unidad de recirculación (Carbó et al., 2003) que mantuvo constantes los parámetros físico-químicos y biológicos durante todo el periodo de estudio. La temperatura del agua se mantuvo a 19±1 °C y la salinidad

a 34 g l<sup>-1</sup>, las condiciones de fotoperiodo fueron de 18:6 h (L:O). Se utilizaron tres réplicas para cada una de las emulsiones experimentales. La densidad de nauplios de *Artemia* suministrados se ajustó para que fuera del 70% de peso seco corporal de las larvas entre los días 5 y 15, del 20% entre los días 16 y 25, del 15% entre los días 26 y 30 y del 7,5% entre los días 31 y 35, de este modo se evitó que quedaran presas vivas residuales desenriquecidas en los tanques. Las presas vivas se distribuyeron dos veces al día. Los tanques se mantuvieron en una renovación diaria del 200%.

Se establecieron como días de muestreo el 1, 4, 6, 10, 12, 15, 20, 30 y 36. En cada uno de ellos se muestrearon 20 larvas por tanque, se dispusieron en vasos de precipitados y se anestesiaron con una concentración letal de MS-222 (1000 mg l<sup>-1</sup>). La longitud se midió utilizando un microscopio de disección (Nikon SMZ800) y un analizador de imágenes (Analysis, SIS GmbH, Alemania). Para determinar el peso seco, las larvas se lavaron con agua destilada para eliminar los restos de sal y se mantuvieron 24 h a 60 °C. Los estadios de migración del ojo de las larvas durante la metamorfosis se determinaron según las pautas descritas por Fernández-Díaz et al. (2001). Los datos se presentaron como la cantidad relativa de larvas en cada uno de los estadios en el mismo día de muestreo. El I<sub>EM</sub> se calculó según Solbakken et al. (1999).

En el día 1 después de la eclosión se tomó una muestra por triplicado ( $n=490$ ) para el análisis bioquímico. Para el análisis de lípidos a día 36, de cada uno de los tanques se tomaron 20 larvas enteras y 20 se diseccionaron en cabeza y carcasa. Las muestras se almacenaron en C:M (2:1, v:v) a -20 °C hasta el día del análisis.

La supervivencia y el patrón de pigmentación se determinaron al final del experimento (36 dph).

#### **6.2.4. Análisis de lípidos**

Los lípidos totales de las presas vivas enriquecidas y de los tejidos larvarios fueron extraídos en C:M (2:1, v:v), siguiendo el método de Folch et al. (1957). Posteriormente se evaporó el solvente bajo flujo de nitrógeno y se cuantificaron los lípidos por gravimetría. Los lípidos totales se almacenaron en C:M (2:1, v:v) con BHT a una concentración de 20 mg ml<sup>-1</sup>.

Para realizar la transmetilación catalizada por ácido se siguió el método de Christie (1982). Los ésteres metílicos se extrajeron dos veces utilizando isohexano : éter dietílico (1:1, v/v), se purificaron en placas de TLC y se analizaron mediante cromatografía gas-líquido. Los ácidos grasos se identificaron mediante comparación con un estándar conocido y se cuantificaron mediante el factor de respuesta de un estándar interno (17:0) añadido antes de la transmetilación.

#### **6.2.5. Estadística**

La varianza de los valores se expresa como la desviación estándar (SD) de la media de tres réplicas. Las diferencias entre las medias de los distintos tratamientos se determinaron mediante el ANOVA de una vía seguido de la prueba de Tukey para la comparación múltiple de medias. El nivel de significación se fijó en  $p \leq 0,05$ . Antes del análisis estadístico, los valores expresados en porcentajes se transformaron mediante el arcosen (Sokal y Rohlf,



1995). Para todos los análisis estadísticos se utilizó el paquete Statgraphics (Microsoft, Inc.).

## **6.3. Resultados**

### **6.3.1. Composición lipídica de las presas vivas**

La composición de los nauplios de *Artemia* tras pasar por el proceso de enriquecimiento se muestra en la Tabla 6.1. No se observaron diferencias significativas en la cantidad de lípidos y ácidos grasos totales. Se observaron diferencias significativas en el contenido de 14:0, 18:0, OA, MUFA y DHA, reflejando la composición de las emulsiones. La concentración de DHA que se observó en los nauplios de *Artemia* de los distintos grupos fue 0,0 para DHA-N, 1,5 para DHA-L, 2,4 para DHA-M y 4,7 para DHA-H mg g<sup>-1</sup> DW.

### **6.3.2. Efectos sobre las larvas**

Los resultados de crecimiento y supervivencia se muestran en la Tabla 6.2. Las larvas alimentadas con la *Artemia* enriquecida con la emulsión DHA-M mostraron un crecimiento significativamente mayor desde el día 20 y en el último día de muestreo presentaron una talla significativamente mayor que las larvas alimentadas con DHA-L y DHA-H ( $P < 0,00001$ ,  $F_{3,18}$ , Figura 6.1). El peso seco no mostró diferencias significativas al final del experimento ( $P = 0,190$ ,  $F_{3,18}$ ), aunque las larvas del grupo DHA-M mostraron un peso significativamente mayor que las de los grupos DHA-N y DHA-L en el día 20 ( $P < 0,009$ ) y significativamente mayor que el resto de los grupos en el día 30 ( $P < 0,006$ , Figura

6.1). La supervivencia no mostró diferencias significativas entre los grupos ( $P=0,265$ ,  $F_{3,10}$ , Tabla 6.2), con una media aproximada del 81%.

	DHA-N	DHA-L	DHA-M	DHA-H
Talla (mm)	10,6±1,3 <sup>b,c</sup>	10,2±1,2 <sup>a,b</sup>	10,9±0,8 <sup>c</sup>	9,8±1,0 <sup>a</sup>
Peso (mg)	3,0±0,4	2,7±0,9	3,1±0,3	2,4±0,4
Supervivencia (%)	77,0±8,4	85,2±15,6	72,2±2,0	89,8±8,0

Tabla 6.2. Crecimiento y supervivencia de las larvas del lenguado senegalés después de 36 días de alimentarse con *Artemia* enriquecida en las distintas emulsiones experimentales (media±SD, n=3).

Los distintos superíndices indican diferencias significativas entre los grupos ( $P<0,05$ ).

Se encontraron diferencias significativas ( $P<0,05$ ) en el estadio de metamorfosis entre los días 12 y 20, siendo las larvas del grupo DHA-H las que mostraron estadios de migración del ojo menos avanzados ( $I_{EM}$  1,3 y 4,6 en los días 12 y 20, respectivamente) que aquellas larvas que ingirieron cantidades menores de DHA. A partir del día 20, incrementos en la cantidad de DHA por encima de 2,4 mg g<sup>-1</sup> DW de *Artemia* (DHA-M), retrasan el grado de migración del ojo y el crecimiento, siendo el grupo DHA-M el que mostró una migración del ojo más avanzada (4,88), seguido por los grupos DHA-N y DHA-L (4,78 y 4,75, respectivamente), el grupo DHA-H fue el que mostró una migración más retrasada (4,6) (Figura 6.2). Al final del experimento, todos los grupos mostraron una metamorfosis completa y normal. A lo largo de todo el experimento, no se observaron individuos con problemas pigmentarios.

### **6.3.3. Efectos de la dieta sobre la composición de lípidos y ácidos grasos de los tejidos larvarios**

Al final del experimento la composición lipídica de las larvas guardó relación con la composición de los nauplios de *Artemia* enriquecida de la que se habían alimentado (Tabla 6.3). El contenido en lípidos totales fue significativamente menor en el grupo DHA-H (16,5 mg g<sup>-1</sup>) que en el resto de los grupos (31,9, 39,3 y 26,3 mg g<sup>-1</sup> DW en los grupos DHA-N, DHA-L y DHA-M, respectivamente). El contenido en ácidos grasos de las larvas reflejó la composición de las dietas. La concentración de DHA fue significativamente mayor en las larvas del grupo DHA-H, mientras que la menor concentración se observó en las larvas del grupo DHA-N. En las larvas del grupo DHA-N se observó un contenido significativamente mayor de OA (39,5% TFA) al compararlo con el contenido de las larvas de los otros grupos (del 20,5% al 26,9% TFA).

El contenido en lípidos totales y la composición en ácidos grasos de los tejidos cefálicos y de las carcasas se muestran en las Tablas 6.4 y 6.5. El contenido en lípidos totales fue significativamente mayor en el tejido cefálico de las larvas del grupo DHA-M y en las carcasas de los grupos DHA-N y DHA-L. La composición en ácidos grasos de ambos tejidos se corresponde con la composición de las dietas, mostrando algunos cambios en el contenido de DHA, OA y MUFA. El contenido de DHA aumenta en ambos tejidos a medida que aumenta su contenido en la dieta, a expensas de una disminución en el contenido de OA y MUFA. Las relaciones n-3/n-6 y DHA/EPA también muestran diferencias significativas entre los grupos, siendo las larvas alimentadas con nauplios enriquecidos en DHA-M y DHA-H las que mostraron

unas valores mayores. El contenido en ácidos grasos del tejido cefálico no mostró diferencias significativas entre los grupos, en cambio si se observaron diferencias entre la cantidad de lípidos totales, siendo los grupos DHA-N y DHA-H los que mostraron niveles más bajos (Tabla 6.4.). Las concentraciones de DHA en los tejidos cefálicos de los distintos grupos fueron 0,3, 1,6, 1,4 y 2,3 mg g<sup>-1</sup> DW para los grupos DHA-N, DHA-L, DHA-M y DHA-H, respectivamente. La acumulación de DHA en los lípidos del tejido cefálico fue similar para los grupos que se alimentaron de *Artemia* enriquecida con las emulsiones DHA-L y DHA-M, mientras que los grupos con una ingesta de DHA mayor, mostraron un aumento en el contenido de DHA del tejido cefálico. Se observaron diferencias significativas en el contenido total de ácidos grasos de las carcasas, siendo el grupo DHA-N el que presentó menor cantidad. Las concentraciones de DHA en las carcasas fueron de 0,5, 0,6, 0,6 y 1,3 mg g<sup>-1</sup> DW para los grupos DHA-N, DHA-L, DHA-M y DHA-H, respectivamente, mientras que el OA mostró una tendencia totalmente opuesta, sus concentraciones fueron 6,9, 3,0, 1,1 y 1,7 mg g<sup>-1</sup> DW, respectivamente.

*Distintas concentraciones de DHA en la dieta provocan efectos en el crecimiento, en la supervivencia y en el perfil de ácidos grasos de los tejidos de las larvas del lenguado senegalés*

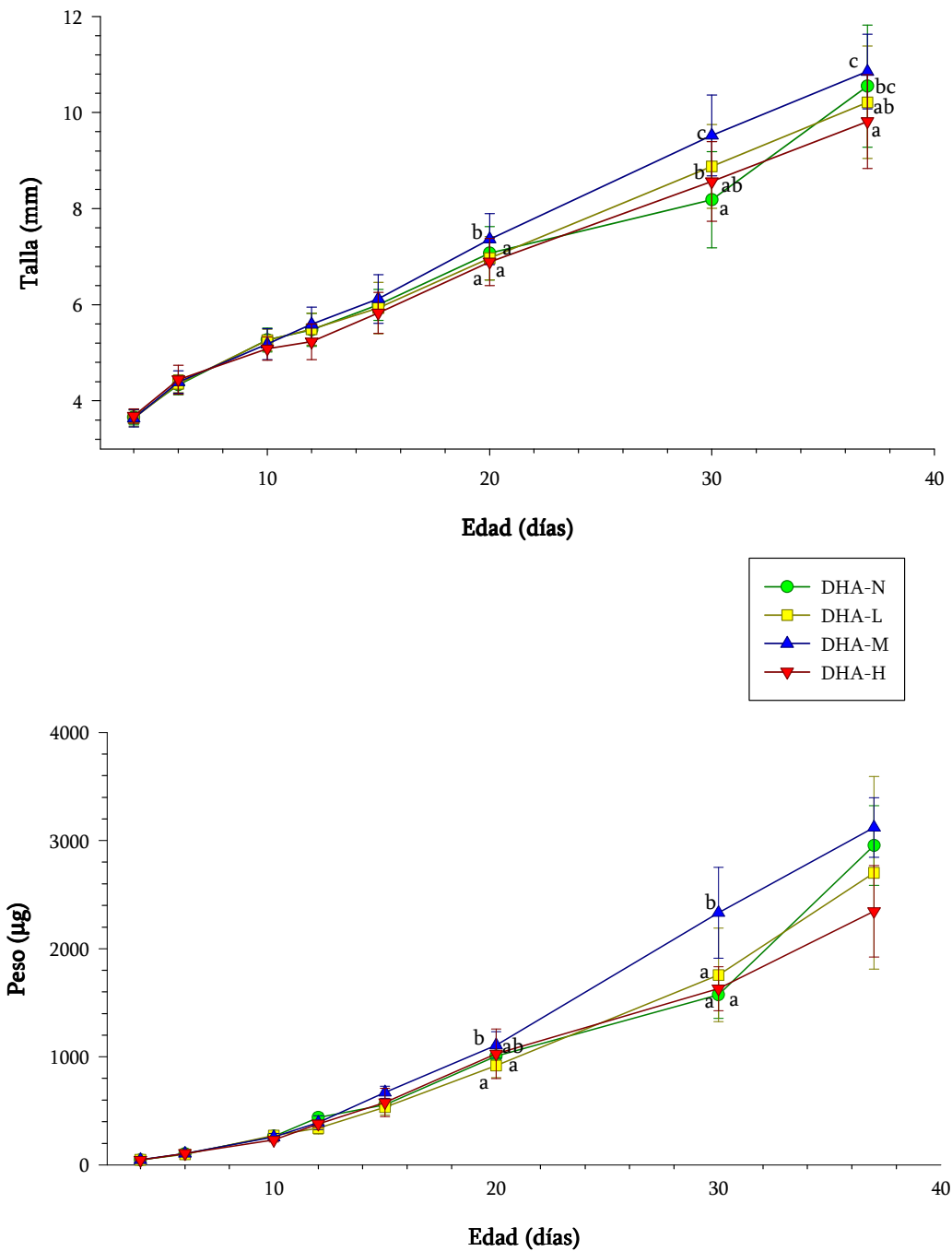


Figura 6.1. Cambios en talla y peso seco de las larvas del lenguado senegalés, a lo largo del periodo de estudio (media±SD,  $n=3$ ). Los superíndices indican diferencias significativas ( $P<0,05$ ) entre los distintos tratamientos.

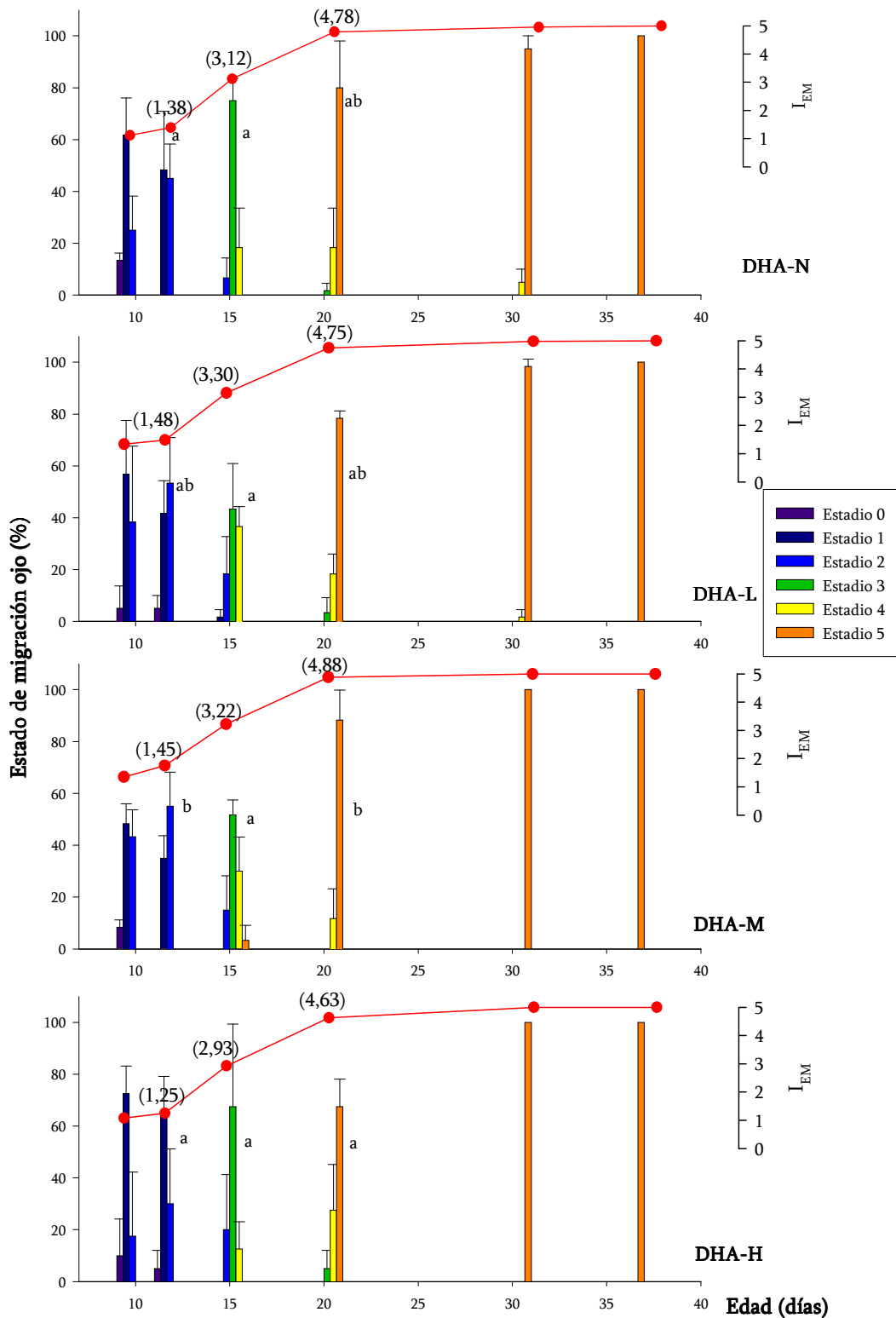


Figura 6.2. Proporciones de los distintos estadios de migración del ojo en los días de muestreo. Las barras verticales indican porcentaje $\pm$ SD de larvas en cada uno de los estadios de migración. Los distintos superíndices marcan las diferencias significativas ( $P<0,05$ ) entre los distintos tratamientos para una misma edad. El I<sub>EM</sub> se muestra como una línea por encima de las barra verticales, los valores entre paréntesis aparecen cuando se encontraron diferencias significativas en el I<sub>EM</sub> ( $P<0,05$ ) entre las larvas de los distintos tratamientos para una misma edad.

---

## 6.4. Discusión

Las larvas del lenguado senegalés, hasta el día 36 después de la eclosión, son capaces de sobrevivir y crecer cuando se alimentan de nauplios de *Artemia* que no contienen DHA, pero sí otros PUFA n-3. Esto sugiere que el lenguado senegalés tiene unos bajos o nulos requerimientos por este ácido graso. Estos resultados están apoyados por el trabajo de Morais et al. (2004b), quienes encontraron que hasta los 38 días distintos grupos de larvas de lenguado senegalés crecían igual, independientemente de las concentraciones de DHA presentes en la *Artemia* (de 0,1 a 4,9 mg g<sup>-1</sup> DW). Resultados similares se han obtenido en distintas especies de peces planos, como *P. olivaceus* (Izquierdo et al., 1992), *S. solea* (Tzoumas, 1988) y *P. platessa* (Dickey-Collas y Geffen., 1992), en los que, si hay una adecuada concentración de EPA en la dieta no necesitan DHA. Sin embargo, hay peces planos con estadios larvarios más largos que los del lenguado senegalés, como pueden ser *S. maximus* (Le Milinaire, 1984; Bell et al., 1985) o *L. ferruginea*, que necesitan aportes de DHA, ARA y EPA para un crecimiento normal y sin DHA en la dieta registran elevadas mortalidades. El bajo requerimiento en DHA que se observa en este capítulo puede explicar la

	Iniciales	DHA-N	DHA-L	DHA-M	DHA-H
Lípidos Totales (mg g <sup>-1</sup> ) (DW)	53,2±5,4	31,9±6,8 <sup>b,c</sup>	39,3±1,2 <sup>c</sup>	26,3±3,3 <sup>b</sup>	16,5±1,5 <sup>a</sup>
TFA (mg g <sup>-1</sup> ) (DW)	46,4±4,3	11,4±3,5	21,8±0,0	14,9±3,9	9,9±3,3
14:0	0,9±0,1	0,9±0,1	1,6±0,3	1,6±0,3	1,7±0,3
16:0	21,7±0,1	15,0±0,1 <sup>a</sup>	22,8±4,4 <sup>c</sup>	19,0±0,4 <sup>c</sup>	10,2±0,9 <sup>a</sup>
18:0	10,3±1,7	14,0±1,6	16,0±2,5	13,5±1,2	17,0±5,2
Total saturados	33,9±1,2	30,0±1,9	42,2±7,0	35,4±1,2	29,9±1,0
16:1n-7	3,9±0,2	2,5±0,2	2,0±0,5	1,6±0,2	1,8±0,4
18:1n-9	9,1±0,2	39,5±2,1 <sup>b</sup>	26,9±5,3 <sup>a</sup>	20,5±1,6 <sup>a</sup>	20,9±5,7 <sup>a</sup>
20:1n-9	0,4±0,1	1,8±0,0 <sup>b</sup>	1,2±0,5 <sup>a,b</sup>	0,6±0,0 <sup>a</sup>	1,0±0,4 <sup>a,b</sup>
Total monoinsaturados	17,7±1,6	55,6±2,4 <sup>b</sup>	38,1±7,9 <sup>a</sup>	30,0±2,5 <sup>a</sup>	32,2±9,4 <sup>a</sup>
18:2n-6	0,8±0,0	7,6±0,2 <sup>a,b</sup>	5,4±2,4 <sup>a,b</sup>	7,0±0,1 <sup>a</sup>	8,2±0,0 <sup>b</sup>
20:2n-6	0,3±0,1	0,2±0,0	0,3±0,1	0,3±0,0	0,4±0,0
20:3n-6	0,8±0,0	0,3±0,1	0,6±0,3	0,5±0,6	0,3±0,0
20:4n-6	3,0±0,0	2,2±0,2	1,5±0,6	2,6±0,3	2,5±0,7
Total PUFA n-6	6,1±0,5	10,8±0,6	11,4±0,8	11,0±0,6	11,8±1,0
18:3n-3	0,3±0,0	10,2±0,4	8,7±0,9	8,1±0,4	8,8±0,0
20:5n-3	5,5±0,8	0,9±0,0	0,7±0,1	1,3±0,1	1,5±0,4
22:5n-3	5,2±0,6	0,8±0,0	0,9±0,1	1,4±0,2	1,5±0,6
22:6n-3	30,9±3,2	1,5±0,2 <sup>a</sup>	4,5±2,1 <sup>b</sup>	10,5±1,1 <sup>b,c</sup>	14,1±3,0 <sup>c</sup>
Total PUFA n-3	42,3±1,6	15,8±0,1 <sup>a</sup>	12,1±3,5 <sup>a,b</sup>	23,6±1,0 <sup>b,c</sup>	30,2±5,0 <sup>c</sup>
Total PUFA	48,4±1,2	26,5±0,5 <sup>a</sup>	33,4±4,2 <sup>a,b</sup>	34,6±1,4 <sup>a,b</sup>	37,7±3,9 <sup>b</sup>
n-3/n-6	6,9±0,7	1,5±0,1	1,4±0,6	2,2±0,1	2,2±0,5
DHA/EPA	6,1±0,2	1,7±0,1 <sup>a</sup>	3,8±1,2 <sup>b</sup>	8,1±0,4 <sup>c</sup>	9,7±3,2 <sup>c</sup>
EPA/ARA	0,7±0,1	0,4±0,0	0,5±0,1	0,5±0,0	0,6±0,0

Tabla 6.3. Composición en %TFA de las larvas de lenguado senegalés, recién eclosionadas (1 dph) y en el último día de muestreo (36 dph) (media±SD,  $n = 3$ ).

Los totales incluyen algunos componentes minoritarios que no se muestran.

Los superíndices (a, b, c) marcan las diferencias significativas entre los tratamientos ( $P < 0,05$ ,  $F_{3,11}$ ).



	DHA-N	DHA-L	DHA-M	DHA-H
Lípidos Totales (mg g <sup>-1</sup> ) (DW)	28,9±7,2 <sup>a</sup>	49,0±16,8 <sup>a,b</sup>	50,3±7,7 <sup>b</sup>	29,4±0,3 <sup>a</sup>
TFA (mg g <sup>-1</sup> ) (DW)	10,0±4,1	20,1±4,5	15,7±2,4	16,1±6,4
14:0	0,8±0,1 <sup>a</sup>	1,2±0,2 <sup>a,b</sup>	1,7±0,3 <sup>b</sup>	1,2±0,4 <sup>a,b</sup>
16:0	18,5±0,4	15,0±0,2	24,4±2,6	18,9±1,2
18:0	13,3±0,6	15,1±2,5	17,3±1,6	15,0±0,6
Total saturados	33,9±0,1 <sup>a</sup>	33,0±3,5 <sup>a,b</sup>	44,7±4,7 <sup>b</sup>	36,3±0,7 <sup>a,b</sup>
16:1n-7	1,7±0,1 <sup>b</sup>	1,3±0,2 <sup>a</sup>	1,1±0,1 <sup>a</sup>	1,1±0,2 <sup>a</sup>
18:1n-9	26,7±0,8 <sup>a,b</sup>	28,4±5,4 <sup>b</sup>	21,3±1,6 <sup>a</sup>	17,8±3,0 <sup>a</sup>
20:1n-9	0,3±0,0	0,3±0,1	0,4±0,2	0,5±0,1
Total monoinsaturados	36,6±1,1 <sup>a,b</sup>	38,8±8,1 <sup>b</sup>	29,5±3,3 <sup>a</sup>	30,4±10,0 <sup>a</sup>
18:2n-6	7,3±0,0 <sup>b</sup>	7,6±0,5 <sup>b</sup>	5,4±0,9 <sup>a</sup>	5,5±1,3 <sup>a</sup>
20:2n-6	0,4±0,1	0,4±0,1	0,3±0,1	0,4±0,1
20:3n-6	0,9±0,8	0,6±0,1	0,1±0,1	0,6±0,1
20:4n-6	2,9±0,1	2,7±0,5	1,9±0,6	1,8±0,8
Total PUFA n-6	12,1±0,8 <sup>b</sup>	11,7±0,2 <sup>b</sup>	7,9±2,0 <sup>a</sup>	8,8±2,1 <sup>a</sup>
18:3n-3	8,5±0,1 <sup>b</sup>	8,6±1,8 <sup>b</sup>	5,4±0,8 <sup>a</sup>	5,1±2,1 <sup>a</sup>
20:5n-3	1,4±0,1	1,3±0,2	0,9±0,4	1,7±0,3
22:5n-3	1,6±0,1	1,6±0,4	1,0±0,5	1,5±0,1
22:6n-3	3,3±0,3 <sup>a</sup>	8,2±1,6 <sup>b</sup>	9,1±3,9 <sup>b,c</sup>	14,5±5,0 <sup>c</sup>
Total PUFA n-3	17,5±0,4	22,2±0,1	17,9±6,1	24,7±7,3
Total PUFA	29,5±1,3	33,7±0,4	25,8±8,0	33,4±9,4
n-3/n-6	1,4±0,1 <sup>a</sup>	1,9±0,1 <sup>a,b</sup>	2,2±0,2 <sup>b</sup>	2,8±0,2 <sup>b</sup>
DHA/EPA	2,4±0,1 <sup>a</sup>	6,2±0,3 <sup>b</sup>	10,6±0,2 <sup>c</sup>	8,9±4,4 <sup>b,c</sup>
EPA/ARA	0,5±0,0	0,5±0,0	0,5±0,0	1,1±0,7

Tabla 6.4. Composición en %TFA del tejido cefálico (incluyendo ojos y cerebro) de las larvas del lenguado senegalés después de alimentarse durante 36 días de nauplios de *Artemia* enriquecidos con las emulsiones experimentales (media±SD,  $n = 3$ ).

Los totales incluyen algunos componentes minoritarios que no se muestran.

Los superíndices (a, b, c) marcan las diferencias significativas entre los tratamientos ( $P < 0,05$ ,  $F_{3,11}$ ).

	DHA-N	DHA-L	DHA-M	DHA-H
Lípidos Totales (mg g <sup>-1</sup> ) (DW)	41,8±5,9 <sup>b</sup>	34,6±8,0 <sup>b</sup>	13,6±2,4 <sup>a</sup>	17,5±2,7 <sup>a</sup>
TFA (mg g <sup>-1</sup> ) (DW)	20,6±2,2 <sup>c</sup>	11,7±5,3 <sup>a,b</sup>	5,4±0,5 <sup>a</sup>	10,4±1,7 <sup>b</sup>
14:0	0,7±0,1 <sup>a</sup>	1,3±0,1 <sup>a,b</sup>	1,5±0,2 <sup>a,b</sup>	1,6±0,1 <sup>b</sup>
16:0	16,5±8,9	19,5±2,6	18,0±1,6	19,0±3,5
18:0	12,9±0,0	13,6±1,5	13,1±1,7	15,3±4,2
Total saturados	31,0±8,1	35,8±4,4	33,7±3,6	37,1±8,1
16:1n-7	1,7±0,5	1,8±0,2	0,7±0,0	1,5±0,1
18:1n-9	33,7±0,4 <sup>c</sup>	26,0±3,2 <sup>b,c</sup>	20,7±1,4 <sup>b</sup>	16,8±0,3 <sup>a</sup>
20:1n-9	0,8±0,5	1,0±0,3	0,6±0,1	0,6±0,0
Total monoinsaturados	47,0±0,4 <sup>c</sup>	37,4±5,3 <sup>b,c</sup>	30,4±1,4 <sup>b</sup>	25,9±0,4 <sup>a</sup>
18:2n-6	9,6±0,0 <sup>b</sup>	6,8±1,3 <sup>a</sup>	7,3±0,1 <sup>a</sup>	7,7±0,8 <sup>a</sup>
20:2n-6	0,4±0,0	0,3±0,0	0,4±0,0	0,4±0,1
20:3n-6	0,7±0,1	0,3±0,4	0,7±0,6	0,3±0,0
20:4n-6	3,3±0,1	2,3±1,0	2,6±0,2	2,6±0,5
Total PUFA n-6	13,6±0,1 <sup>b</sup>	10,0±2,9 <sup>a</sup>	11,6±0,9 <sup>a</sup>	11,4±1,3 <sup>a</sup>
18:3n-3	13,6±0,1 <sup>b</sup>	7,8±1,9 <sup>a</sup>	8,5±0,4 <sup>a</sup>	8,2±1,5 <sup>a</sup>
20:5n-3	1,6±0,1	1,1±0,5	1,5±0,1	1,5±0,4
22:5n-3	1,2±0,0	1,1±0,7	1,4±0,2	1,6±0,4
22:6n-3	2,2±0,0 <sup>a</sup>	4,8±0,1 <sup>b</sup>	10,3±0,8 <sup>c</sup>	12,3±3,5 <sup>d</sup>
Total PUFA n-3	22,0±0,1	16,8±4,5	24,3±1,4	25,8±6,3
Total PUFA	36,6±0,0	38,1±6,3	35,8±2,3	37,1±7,6
n-3/n-6	1,5±0,0 <sup>a</sup>	1,7±0,2 <sup>a,b</sup>	2,1±0,1 <sup>b</sup>	2,3±0,3 <sup>b</sup>
DHA/EPA	1,4±0,1 <sup>a</sup>	4,4±0,6 <sup>b</sup>	6,7±0,2 <sup>c</sup>	8,2±0,0 <sup>d</sup>
EPA/ARA	0,5±0,0	0,5±0,0	0,6±0,1	0,6±0,1

Tabla 6.5. Composición en %TFA de las carcasas de las larvas del lenguado senegalés después de alimentarse durante 36 días de nauplios de *Artemia* enriquecidos con las emulsiones experimentales (media±SD,  $n = 3$ ).

Los totales incluyen algunos componentes minoritarios que no se muestran.

Los superíndices (a, b, c, d) marcan las diferencias significativas entre los tratamientos ( $P < 0,05, F_{3,11}$ ).

facilidad de cultivo y la elevada supervivencia del lenguado senegalés alimentado con múltiples tipos de *Artemia*, considerada generalmente como deficiente en los distintos EFA (Sargent et al., 1999b).

La metamorfosis del lenguado senegalés cultivado a  $20\pm 1$  °C es un proceso temprano y rápido. Se inicia alrededor de los 10 días después de la eclosión, cuando las larvas empiezan a migrar al fondo de los tanques y la morfología de su cuerpo empieza a ser la típica de un pez plano, y concluye a los 20 - 25 días, cuando la migración del ojo se ha completado. Durante este periodo de desarrollo larvario, el crecimiento, la ingesta y el consumo de oxígeno disminuyen (Parra, 1998). Una vez la metamorfosis se ha completado estos parámetros vuelven a aumentar junto con la energía utilizada para el metabolismo, en cambio, la energía utilizada para el crecimiento disminuye significativamente (Parra, 1998). Después de la metamorfosis los peces planos utilizan la mayor parte de su energía en nadar, buscar alimento, alimentarse y evitar a los posibles depredadores enterrándose en los fondos arenosos (Miyazaki et al., 2000). De acuerdo con lo descrito por Parra (1998) y Youson (1988), en los estadios previos a la metamorfosis la concentración de lípidos en el cuerpo aumenta, para así poder ser utilizados durante la metamorfosis y compensar la reducción en el consumo de alimento durante este periodo. En este capítulo no se analizó el contenido total de lípidos de las larvas en distintos estadios de desarrollo, solo al final del experimento, cuando los individuos han pasado a ser juveniles. Sin embargo, puede ser que durante los primeros diez días de desarrollo larvario, los requerimientos en lípidos totales, en PUFA n-3 y en DHA, sean distintos que los requerimientos post-metamórficos. Estos cambios

pueden ser debidos a los distintos nichos que ocupan los peces planos a lo largo de su desarrollo.

En la cadena alimentaria pelágica, las larvas carnívoras tienen acceso a abundantes fuentes de DHA (Kainz et al., 2004), como le ocurre a la larva salvaje de lenguado senegalés antes de la metamorfosis (de 3 a 8 mm de longitud total; Drake y Arias, 1993), que se alimenta principalmente de copépodos (80,3% del contenido del estómago) y larvas velígeras (13,4% del contenido del estómago), ambos ricos en ácidos grasos PUFA n-3, como el DHA (Holland, 1978; Sargent y Falk-Peterson, 1988; Morehead et al., 2005). Después de la metamorfosis y la migración hacia el fondo arenoso, los peces bentónicos se alimentan de algas diatomeas, muy ricas en los ácidos grasos EPA y 16:0 (Kates y Volcani, 1966; Graeve et al., 1997) y de poliquetos (75% del contenido del estómago, Cabral 2000), incluyendo *Hediste* sp. (64,6% del contenido del estómago) que también es rico en EPA (24,4% TFA, Copeman y Parrish, 2003). En consecuencia, a pesar de la disponibilidad y consumo inicial de DHA en el medio natural, las larvas del lenguado senegalés están bien adaptadas a consumir EPA como fuente principal de PUFA n-3 durante largos periodos de tiempo, lo que puede explicar el nulo requerimiento en DHA cuando el EPA está presente, que es lo que se observa en este capítulo. El posible requerimiento en DHA durante los periodos pre-metamórficos no se ha estudiado en este capítulo, quizá las larvas de lenguado senegalés alimentadas con nauplios de *Artemia* deficientes en DHA, conservan las reservas endógenas de este ácido graso para poder llevar a cabo la metamorfosis con éxito. Mourente y Vazquez (1996) observaron que durante periodos de ayuno las larvas del lenguado senegalés utilizaban los triglicéridos

como fuente de energía, con la consecuente disminución en la cantidad de SFA y MUFA y la conservación de DHA y ARA.

En estudios llevados a cabo durante largos periodos de tiempo o durante épocas en las que se aumentan las demandas de nutrientes como puede ser la metamorfosis (Dhert et al., 1990; Howell et al., 1995), los efectos biológicos de aumentar la cantidad de DHA, como pueden ser el aumento del crecimiento o de la supervivencia, se vuelven más claros que los resultados de los estudios que se llevan a cabo en larvas desde el primer día de alimentación (Brandsen et al., 2004, 2005b). Así, los estudios a largo tiempo para evaluar los requerimientos en DHA por parte de la larva del lenguado senegalés son justificables. Si embargo, de este capítulo se puede deducir que ya que en el medio natural, y una vez realizada la metamorfosis, el lenguado senegalés está expuesto a una mayor cantidad de EPA que de DHA, los requerimientos en DHA se pueden considerar insignificantes en post-larvas y juveniles de lenguado senegalés, no sucediendo lo mismo en peces pelágicos.

Si el alimento está disponible, el lenguado senegalés muestra una ingesta continua y un eficiente y rápido desarrollo (Yúfera et al., 1999a). Así, como este experimento se llevó a cabo a  $20 \pm 1$  °C, las larvas fueron capaces de completar la metamorfosis y adquirir la vida bentónica con una baja mortalidad y en menos de tres semanas. La fisiología alimentaria y el comportamiento de las larvas durante el desarrollo hacen posible que se llegue al estado juvenil con éxito (Sarasquete et al., 1996; Morais et al., 2004a). En el presente capítulo la tasa diaria de crecimiento en peso entre los días 2 y 15 varió entre  $21,7 \pm 0,8\%$  día<sup>-1</sup> para el grupo DHA-H y  $24,0 \pm 1,0\%$  día<sup>-1</sup> para el grupo DHA-M. Después de la metamorfosis (entre los días 15 y 35) y una vez los peces adquirieron la vida

bentónica, la tasa de crecimiento disminuyó significativamente en todos los grupos experimentales ( $7,6\pm 1,1$ ,  $7,2\pm 1,3$ ,  $7,0\pm 0,6$  y  $7,0\pm 0,6\%$  día<sup>-1</sup> para los grupos DHA-N, DHA-L, DHA-M y DHA-H, respectivamente). Generalmente, las larvas que se alimentaron de la dieta DHA-H mostraron las tasas de crecimiento más bajas, a pesar de que esta dieta contiene la concentración más elevada de DHA. Los SFA y MUFA, particularmente el 16:0, OA, 20:1n-9 y 22:1n-11 son catabolizados fácilmente por los peces para obtener energía, mientras que el DHA no se cataboliza fácilmente por la vía de la  $\beta$ -oxidación (Sargent et al., 2002). En consecuencia, el aumento en el contenido de DHA en la dieta y la reducción en los MUFA, en particular el OA, que se puede observar en la dieta de las larvas del grupo DHA-H al compararlo con los otros grupos, puede llevar a una disponibilidad de energía menor y en consecuencia a una tasa reducida de crecimiento y metamorfosis. Este punto, sin embargo, necesitaría investigaciones posteriores para ser aclarado completamente. Las diferencias en crecimiento durante y después de la metamorfosis también se observaron en el capítulo anterior (Villalta et al., 2005a), aunque en ese caso la tasa de crecimiento después de la metamorfosis fue mayor y varió entre 9,4 y 11% día<sup>-1</sup>. Estas diferencias de crecimiento entre los distintos experimentos pueden ser explicadas en términos de supervivencia larvaria y por lo tanto de densidad final en los tanques de cultivo (17 – 20 larvas l<sup>-1</sup> en el capítulo anterior comparado con 36 – 45 larvas l<sup>-1</sup> en el presente capítulo) y la disponibilidad de presas vivas (alrededor de 400 nauplios por larva en el capítulo anterior comparado con 270 – 330 nauplios por larva en el presente).

La composición en ácidos grasos de las larvas de día 1 fue similar a otros resultados obtenidos para las larvas de lenguado senegalés (Vazquez et al., 1994;

Villalta et al., 2005a). Las proporciones de ácidos grasos en la larva entera, el tejido cefálico y la carcasa de las larvas del lenguado senegalés reflejan las proporciones en el alimento. En particular, el DHA aumenta en todos los tejidos del mismo modo que aumenta en los contenidos de las dietas. Es interesante observar que las proporciones de DHA en el contenido total de los cuerpos fue menor para larvas de 36 días que para larvas de 1 día (30,9% TFA). Aunque en todas las dietas se evitó la presencia de DPA, en todos los tejidos larvarios analizados se observó una concentración de este ácido graso del 1% aproximadamente. La presencia de DPA puede provenir de contenidos residuales del saco vitelino (las larvas iniciales contienen 5,2% TFA de este ácido graso), de la retro-conversión del DHA al EPA que se da en los nauplios de *Artemia* o de una posible elongación del EPA por parte de las larvas. En el capítulo anterior se creó la hipótesis de que la acumulación de DPA en los tejidos larvarios del lenguado senegalés puede indicar un inadecuado aporte exógeno de DHA (Villalta et al., 200a), si bien, la ausencia de datos biológicos que apoyen esta hipótesis y una vida adaptada a bajos aportes exógenos de DHA, hace que los contenidos de DPA sean probablemente debidos a las reservas endógenas o al metabolismo de la *Artemia*.

El ARA decrece en el tejido cefálico (en las dietas se mantiene constante) a medida que aumenta el DHA de la dieta, mostrando así una interacción de competencia ya encontrada por Harel et al. (2000) para las larvas de *M. chrysops*. Teniendo en cuenta que tanto la familia n-3 como la n-6 comparten las mismas vías metabólicas de degradación, elongación y desaturación, un suplemento alimentario de ARA, especialmente en el caso en el que el DHA es

deficiente, implica que las fuentes para la desaturación y elongación destinadas a la producción y preservación del DHA en los tejidos, serán más accesibles.

Los lípidos en forma de SFA y MUFA son la base para el metabolismo energético (Sargent et al., 2002). El balance entre los PUFA necesarios para mantener la integridad funcional de las membranas celulares y los ácidos grasos menos insaturados necesarios para adquirir energía, es de vital importancia (Sargent et al., 1995). En el presente capítulo, las dietas con cantidades medias y altas de DHA, contenían bajos niveles de OA y MUFA. Estos ácidos grasos son principalmente almacenados en los lípidos totales en forma de triglicéridos, que efectivamente actúan como reserva lipídica. Como consecuencia, el pez que ingirió nauplios de *Artemia* con bajos contenidos en DHA, presentó un contenido dos veces más elevado de reservas lipídicas en el cuerpo y un contenido seis veces más alto de OA, que aquellos peces que ingirieron niveles medios y altos de DHA.

En el tejido cerebral y en la retina el DHA es el ácido graso más abundante (Mourente, 2003). Se sabe que las larvas con un déficit alimentario en DHA presentan problemas visuales (Bell et al., 1995b), reducen la tasa alimentaria (Bransden et al., 2005e) y alteran su comportamiento de grupo (Masuda et al., 2001). Todos estos problemas no podrán ser rectificadas en estadios posteriores. En este capítulo no se determinó la habilidad de las larvas del lenguado senegalés para alimentarse de las presas vivas y por lo tanto, no se pudo establecer si hubo un posible efecto de los tratamientos. Pero una falta de correlación entre el contenido alimentario de DHA y el crecimiento, probablemente indica que el bajo contenido alimentario en DHA no afectó a la visión y en consecuencia no afectó a la alimentación. No obstante, las larvas del



lenguado senegalés son capaces de alimentarse durante la noche (Drake y Arias, 1993), lo que indica que la detección de las presas no ocurrirá solo por medios visuales, así que será necesario de próximos trabajos para establecer el papel del DHA sobre la visión del lenguado.

En resumen, con el estudio dosis-respuesta para determinar el efecto del DHA presente en la dieta sobre las larvas de lenguado senegalés hasta los 36 días después de la eclosión, no se encontró ninguna relación significativa entre el contenido de DHA en la dieta y los parámetros larvarios. Los resultados indicaron que, como otros muchos peces planos marinos, los requerimientos nutricionales por el DHA durante la fase larvaria son mucho más bajos que los que se dan en especies marinas pelágicas y carnívoras. En este capítulo se ha formulado la hipótesis de que quizá este hecho es debido a la distribución natural de los peces planos, por la relativa abundancia o escasez de determinados ácidos grasos esenciales en el bentos y posiblemente porque el lenguado senegalés podría alcanzar sus requerimientos nutricionales en PUFA n-3 con cantidades relativamente menores de EPA. Finalmente, los bajos requerimientos, especialmente por el DHA, hacen del lenguado senegalés una especie idónea para la acuicultura, ya que para su alimentación se podría utilizar *Artemia* no enriquecida, habitualmente inadecuada para otras especies de peces marinos por su baja proporción en PUFA n-3.



*7. CAPÍTULO IV: Efectos del EPA*  
sobre el crecimiento, la supervivencia,  
la pigmentación y la composición en  
ácidos grasos de las larvas del lenguado  
senegalés



## **7.1. Introducción**

Las anomalías pigmentarias, junto con las elevadas mortalidades durante la fase de destete (Padrós et al., 2003; Zarza et al., 2003), son considerados los puntos más problemáticos durante la fase de cultivo larvario del lenguado senegalés. En la mayoría de especies de peces planos estudiados hasta la fecha, ambos problemas se han relacionado con el contenido en HUFA de las presas vivas con las que se alimenta a las larvas (Bell et al., 1985; Izquierdo et al., 1992; Bell et al., 1995a, 2003; McEvoy et al., 1998a). El lenguado senegalés no es una excepción y ya en los capítulos anteriores se ha demostrado la relación entre el contenido en HUFA de la dieta, la pigmentación y el desarrollo de las larvas (Villalta et al., 2005a, 2005b).

Durante el desarrollo larvario de los teleósteos, los lípidos juegan un papel importante como fuente de energía metabólica, como componentes de los fosfolípidos de membrana y como precursores de moléculas bioactivas (Sargent et al., 1999b; Tocher et al., 2003). El caso particular del papel de los HUFA en el desarrollo larvario se ha estudiado extensamente (Rainuzzo et al., 1991; Izquierdo et al., 1996; Takeuchi et al., 1996; Estévez et al., 1999; Sargent et al., 1999a, 1999b; Izquierdo et al., 2000), ya que determinar cuales de los HUFA son esenciales para el correcto crecimiento y desarrollo de la larva es un paso importante para la viabilidad comercial del cultivo de muchas especies de peces marinos (Izquierdo et al., 1996; Takeuchi et al., 1996). Los requerimientos de las larvas marinas en general por los HUFA n-3, tanto para el DHA como para el EPA, está bien establecido y se ha demostrado que son ácidos grasos esenciales para el normal desarrollo y supervivencia de la larva (Castell et al., 1994;

Takeuchi et al., 1996; Furuita et al., 1998; McEvoy 1998a; Copeman et al., 2002). Contrariamente, en el capítulo anterior se estableció que el DHA era un ácido graso no esencial para las larvas del lenguado senegalés hasta el día 35 de cultivo, ya que las larvas alimentadas con nauplios de *Artemia* deficientes en este ácido graso mostraron un desarrollo y una pigmentación normal, así como unas altas tasas de supervivencia. También se determinó el requerimiento de las larvas del lenguado senegalés por el ARA (Villalta et al., 2005a), pero el requerimiento por el EPA aún se mantiene incierto. Así, este capítulo se diseñó para investigar el papel del EPA presente en la dieta sobre el crecimiento, la supervivencia y la pigmentación de la larva del lenguado senegalés desde el día 1 hasta el día 40 después de la eclosión.

## **7.2. Material y métodos**

### **7.2.1. Emulsiones experimentales**

Los tipos de aceites comerciales utilizados fueron Neuromins<sup>®</sup> (Martek Bioscience, USA), rico en DHA, Vevodar<sup>®</sup> (DSM, Holanda), rico en ARA y Croda<sup>®</sup> (Incromega EPA500TG, Reino Unido), rico en EPA. Con diferentes combinaciones de estos aceites se consiguieron emulsiones con nulo (EPA-N), bajo (EPA-L), medio (EPA-M) y alto (EPA-H) contenido en EPA. Los componentes usados para cada tipo de emulsión y la composición de los nauplios de *Artemia* una vez enriquecidos se muestran en la Tabla 7.1. Las mezclas de aceites fueron emulsionadas con cantidades equivalentes de agua destilada y homogenizadas con un Ultra-Turrax T25 a gran velocidad, durante 60 s.

Posteriormente las emulsiones se transfirieron a jeringas de plástico y almacenadas a 4 °C hasta la utilización de las emulsiones.

### **7.2.2. Enriquecimiento de las presas vivas**

Los rotíferos se enriquecieron en tanques de 10 l a una densidad de 500 rotíferos ml<sup>-1</sup>, durante 6 h a 20 °C y usando 0,1 g l<sup>-1</sup> de cada una de las emulsiones experimentales. Después de 6 h los rotíferos fueron lavados con abundante agua de mar y con agua dulce durante 1 min. A continuación fueron repartidos a las larvas.

En este experimento se utilizó una cepa de *Artemia* argentina (*A. persimilis*) con bajos contenidos iniciales de EPA, la composición de la *Artemia* no enriquecida se muestra en la Tabla 7.1. La eclosión de los quistes y el enriquecimiento de los nauplios se llevó a cabo en una salinidad del 18 g l<sup>-1</sup> y a una temperatura de 25 °C, siguiendo las recomendaciones del suministrador. La *Artemia* utilizada para el enriquecimiento había eclosionado 6 h antes, fue enriquecida en tanques de 10 l a una densidad de 100 nauplios ml<sup>-1</sup> durante 18 h y usando 0,6 g l<sup>-1</sup> de cada una de las emulsiones experimentales. Los nauplios de *Artemia* enriquecidos fueron lavados con abundante agua de mar y con agua dulce durante 15 min.

Para el análisis de lípidos, se hicieron tres muestreos de nauplios de *Artemia* durante el periodo experimental.

	EPA-N	EPA-L	EPA-M	EPA-H	<i>Artemia</i> no enriquecida
Formulación (mg g <sup>-1</sup> )					
Vevodar <sup>®</sup>	47	31,3	15,1	0,0	
Neuromins <sup>®</sup>	114,8	76,6	38,3	0,0	
Croda <sup>®</sup>	0,0	175,7	351,5	527,8	
Aceite de oliva <sup>a</sup>	366	244,2	123	0,0	
Suplementos <sup>b</sup>	52,2	52,2	52,2	52,2	
Lípidos Totales (mg g <sup>-1</sup> ) (DW)	187,4±11,7	200,3±22,2	208,4±18,0	208,1±56,7	148,2±14,1
TFA (mg g <sup>-1</sup> ) (DW)	119,9±16,4	121,6±9,2	155,4±69,2	115,0±44,1	77,9±0,3
Ácidos grasos					
14:0	1,9±0,3 <sup>c</sup>	1,2±0,3 <sup>b</sup>	0,7±0,2 <sup>a,b</sup>	0,4±0,1 <sup>a</sup>	0,6±0,1
16:0	12,3±0,8 <sup>b</sup>	10,2±0,2 <sup>a,b</sup>	9,1±0,2 <sup>a,b</sup>	8,3±2,3 <sup>a</sup>	14,4±0,3
18:0	3,9±1,5	4,1±0,1	3,8±0,2	3,7±1,0	5,3±0,1
Total saturados	19,4±1,8 <sup>b</sup>	16,2±0,6 <sup>a,b</sup>	14,2±0,5 <sup>a,b</sup>	12,9±3,5 <sup>a</sup>	21,3±0,4
16:1n-7	2,2±0,3	2,2±0,2	2,3±0,1	2,4±0,6	4,5±0,0
18:1n-9	42,6±5,2 <sup>d</sup>	31,3±1,6 <sup>c</sup>	21,6±0,4 <sup>b</sup>	11,5±2,8 <sup>a</sup>	18,2±0,1
18:1n-7	5,0±0,7 <sup>a</sup>	5,3±0,5 <sup>a</sup>	5,5±0,1 <sup>c</sup>	5,9±1,5 <sup>b</sup>	9,1±0,1
20:1n-9	0,5±0,1	0,3±0,3	0,4±0,3	0,4±0,3	0,3±0,5
20:1n-7	0,1±0,1	0,1±0,1	0,1±0,0	0,1±0,0	0,2±0,0
Total monoinsaturados	50,7±4,3 <sup>d</sup>	39,6±1,0 <sup>c</sup>	30,4±0,3 <sup>b</sup>	21,0±5,2 <sup>a</sup>	33,1±0,4
18:2n-6	5,8±0,5	5,7±0,2	5,1±0,2	5,2±0,8	6,3±0,1
20:2n-6	0,2±0,0	0,2±0,0	0,2±0,0	0,2±0,0	0,3±0,0
20:3n-6	0,3±0,1	0,3±0,0	0,3±0,0	0,2±0,0	0,2±0,0
20:4n-6	2,1±0,3	2,2±0,1	2,1±0,1	2,0±0,6	0,0±0,0
Total PUFA n-6	8,9±0,9	9,0±0,4	8,3±0,3	8,3±0,1	7,5±0,1
18:3n-3	12,8±3,9	14,7±2,1	15,7±1,2	16,0±3,7	30,6±0,4
20:5n-3	0,5±0,2 <sup>a</sup>	10,7±0,3 <sup>a,b</sup>	20,3±0,7 <sup>b,c</sup>	29,5±9,7 <sup>c</sup>	0,3±0,5
22:5n-3	0,2±0,4	0,3±0,0	0,5±0,0	0,7±0,3	0,0±0,0
22:6n-3	4,3±0,8	4,7±0,3	4,8±0,2	4,8±1,8	0,1±0,1
Total PUFA n-3	20,9±5,3 <sup>a</sup>	35,2±1,6 <sup>b</sup>	47,1±1,0 <sup>b,c</sup>	57,8±8,7 <sup>c</sup>	38,1±0,1
Total PUFA	29,8±6,1 <sup>a</sup>	44,2±1,6 <sup>b</sup>	55,4±0,8 <sup>b,c</sup>	66,1±8,7 <sup>c</sup>	45,7±0,0
DHA / EPA	8,9±2,6 <sup>b</sup>	0,4±0,0 <sup>a</sup>	0,2±0,0 <sup>a</sup>	0,2±0,0 <sup>a</sup>	0,1±0,1
ARA / DHA	0,5±0,0 <sup>b</sup>	0,5±0,0 <sup>a,b</sup>	0,4±0,0 <sup>a</sup>	0,4±0,0 <sup>a</sup>	0,0±0,0
ARA / EPA	4,6±1,6 <sup>b</sup>	0,2±0,0 <sup>a</sup>	0,1±0,0 <sup>a</sup>	0,1±0,0 <sup>a</sup>	0,0±0,0



Tabla 7.1. Formulación de las emulsiones experimentales ( $\text{mg g}^{-1}$ ) y composición en %TFA de la *Artemia* tras el enriquecimiento y sin enriquecer (media $\pm$ SD,  $n=3$ ).

Los totales incluyen algunos componentes que no se muestran.

<sup>a</sup> Procedente de olivas de la variedad Cornicabra, D.O. Montes de Toledo

<sup>b</sup> Suplementos: lecitina de soja, 40,6 mg; vitamina E, 11,6 mg

Los valores en una misma fila pero con superíndices diferentes denotan diferencias significativas entre ellos ( $P<0,05$ ,  $F_{3,11}$ ).

---

### 7.2.3. Cultivo larvario

Los huevos del lenguado senegalés fueron donados por el IFAPA “El Toruño” (Cádiz, España) y obtenidos de reproductores mantenidos en cautividad bajo condiciones naturales de foto y termoperiodo. Los huevos fueron transportados por carretera hasta las instalaciones del CA-IRTA y las larvas eclosionaron durante el transporte. Una vez en las instalaciones donde se llevó a cabo el experimento, las larvas fueron distribuidas en 12 tanques de malla (150  $\mu\text{m}$  de poro) de 35 l de capacidad a una densidad de 50 larvas  $\text{l}^{-1}$ , los tanques a su vez se distribuyeron en cuatro tanques mayores de 1500 l. Los tanques se mantuvieron conectados a una unidad de recirculación que mantuvo las condiciones físico-químicas y biológicas constantes (Carbó et al., 2003) y mantuvo una renovación diaria de un 200%. La temperatura se mantuvo a  $19\pm 1$  °C, la salinidad a 35  $\text{g l}^{-1}$  y el fotoperiodo a 18:6 h (L:O). Las larvas se alimentaron de rotíferos desde el día 3 al día 5 después de la eclosión, a una densidad de 10 rotíferos  $\text{ml}^{-1}$  y de nauplios de *Artemia* desde el día 5 hasta el día 40 después de la eclosión. Con cada una de las presas vivas enriquecidas en las emulsiones experimentales se alimentó a un grupo de tres tanques de 35 l. La densidad de nauplios de *Artemia* a repartir se ajustó para que no sobraran presas desenriquecidas en los tanques, fue del 70% del peso seco corporal de las larvas

entre los días 5 y 15, 20% entre los días 16 y 25, 15% entre los días 26 y 30 y 7% entre los días 31 y 40. La *Artemia* se suministró dos veces al día.

La longitud estándar y el peso seco se midieron en los días 1, 4, 6, 10, 12, 15, 17, 20, 25, 30 y 40 después de la eclosión. En cada uno de estos días se muestrearon 20 larvas de cada uno de los tanques y se sacrificaron en vasos de precipitados con una concentración letal de MS-222 (1000 mg l<sup>-1</sup>). La longitud se midió usando un microscopio de disección (Nikon SMZ800) y un analizador de imágenes (Analysis, SIS GmBh, Alemania). El peso seco se determinó lavando las larvas con agua destilada para eliminar los restos de sal y manteniéndolas durante 24 h a 60 °C. Para la determinación del estadio de migración del ojo durante la metamorfosis se utilizaron las pautas descritas por Fernández-Díaz et al. (2001) y se llevó a cabo en las mismas larvas que se utilizaron para calcular el crecimiento larvario. Los datos se presentan como la cantidad relativa (%) de larvas en cada uno de los estadios de migración para una misma edad. El I<sub>EM</sub> se calculó según Solbakken et al. (1999).

Para el análisis bioquímico, inicialmente se tomaron tres muestras de larvas de día 1 (n=2076), en el día 40 se muestrearon 85 larvas tanque<sup>-1</sup>. Las muestras se almacenaron en C:M (2:1, v:v) a -20 °C.

La supervivencia y la pigmentación se determinaron a día 40 después de la eclosión por conteo de los individuos restantes. Los individuos anormalmente pigmentados, tanto parcial como totalmente, se consideraron como un único grupo debido a la dificultad que representa otorgar distintas categorías o índices de pigmentación (Bolker y Hill, 2000).

#### **7.2.4. Análisis de lípidos**

Los lípidos totales, tanto de las presas vivas enriquecidas como de los tejidos larvarios, se extrajeron en C:M (2:1, v:v) usando el método de Folch et al. (1957) y cuantificados por gravimetría después de la evaporación del solvente bajo flujo de nitrógeno. Los lípidos totales se almacenaron en C:M (2:1, v:v) a una concentración de 10 mg ml<sup>-1</sup> y a -20 °C.

La transmetilación catalizada por ácido se llevó a cabo mediante el método de Christie (1982). Los ésteres metílicos se extrajeron dos veces según lo descrito por Ghioni et al. (1996) y analizados por cromatografía gas-líquido. Los ácidos grasos se identificaron por comparación con un aceite de pescado bien identificado y cuantificados por las medias del factor de respuesta de un estándar interno (17:0) añadido antes de la transmetilación.

#### **7.2.5. Estadística**

La variancia de los datos se expresó como la desviación estándar (SD) de la media de tres réplicas. Las diferencias entre las medias de los distintos tratamientos se determinaron mediante el ANOVA de una vía seguido de la prueba de Tukey para la comparación múltiple de medias. El nivel de significación se fijó en  $p \leq 0,05$ . Antes del análisis estadístico, los valores expresados en porcentajes se transformaron mediante la raíz cuadrada para obtener la normalidad de los datos. Para todos los análisis estadísticos se utilizó el paquete Statgraphics (Microsoft, Inc.).

## **7.3. Resultados**

### **7.3.1. Composición lipídica de las presas vivas**

La composición lipídica y en ácidos grasos de los nauplios de *Artemia* antes y después del proceso de enriquecimiento se muestra en la Tabla 7.1. La composición de los rotíferos no se muestra debido al poco tiempo que se utilizaron como alimento (solo tres días). No se encontraron diferencias significativas en la cantidad de lípidos y ácidos grasos totales entre los distintos tipos de nauplios. Se observaron diferencias significativas en la cantidad de SFA debido a las diferencias presentes en los contenidos relativos de 14:0 y 16:0. También se observaron diferencias significativas entre los MUFA, debido a las diferencias en OA y 18:1n-7. No se observaron diferencias significativas en los PUFA n-6. Las diferencias encontradas en el contenido de PUFA n-3, fueron debidas a las diferencias en EPA, reflejando así la composición de las emulsiones. Las relaciones DHA/EPA, ARA/DHA y ARA/EPA variaron significativamente entre los nauplios del grupo EPA-N, que presentaron los valores mayores, y el resto de los grupos.

### **7.3.2. Efectos sobre las larvas**

Los resultados de crecimiento, supervivencia y pigmentación se muestran en la Tabla 7.2. En cuanto al crecimiento en talla, se observaron diferencias significativas entre los grupos EPA-M y EPA-L en el día 25 de cultivo, entre los grupos EPA-H y EPA-L en el día 30 y al final del experimento, aunque no se apreciaron diferencias significativas, las larvas de mayor tamaño fueron las de los grupos EPA-N y EPA-H (Figura 7.1). Las larvas del grupo EPA-H mostraron

	EPA-N	EPA-L	EPA-M	EPA-H
Talla (mm)	12,1±2,0 <sup>b</sup>	10,0±1,6 <sup>a</sup>	9,8±2,0 <sup>a</sup>	13,0±2,2 <sup>b</sup>
Peso (mg)	5,0±1,3 <sup>b</sup>	3,0±0,8 <sup>a</sup>	3,3±0,8 <sup>a</sup>	7,2±1,8 <sup>c</sup>
Supervivencia (%)	50,6±7,1 <sup>b</sup>	50,3±0,1 <sup>b</sup>	57,7±6,8 <sup>b</sup>	34,1±1,8 <sup>a</sup>
Pigmentación (%)	82,7±3,3 <sup>a</sup>	82,9±0,3 <sup>a</sup>	98,1±0,9 <sup>b</sup>	99,4±0,1 <sup>b</sup>

Tabla 7.2. Crecimiento, supervivencia y pigmentación de las larvas del lenguado senegalés después de 40 días de alimentarse con *Artemia* enriquecida en las distintas emulsiones experimentales (media±SD, n=3).

Los distintos superíndices indican diferencias significativas entre los grupos ( $P < 0,05$ ).

un peso significativamente mayor desde el día 30 hasta el final del periodo de estudio, mientras que las larvas de los grupos EPA-L y EPA-M fueron las que presentaron un menor peso (Figura 7.1). La supervivencia se vio afectada significativamente por los distintos tipos de dieta ( $P < 0,0055$ ,  $F_{3,11}$ , Tabla 7.2), siendo el grupo EPA-H el que mostró una supervivencia más baja comparado con todos los demás grupos, los cuales no mostraron diferencia entre ellos.

En los días 17 y 25 se encontraron diferencias significativas en el estadio de metamorfosis, siendo el grupo EPA-H el que mostró unos estadios de migración del ojo más avanzados que los grupos que ingirieron niveles más bajos de EPA (Figura 7.2). En el día 17, el grupo EPA-M mostró el grado de metamorfosis más retrasado ( $I_{EM} = 1,79$ ), seguido por los grupos EPA-L y EPA-N ( $I_{EM} = 1,83$  y  $1,93$ , respectivamente), mientras que el grupo EPA-H fue el que mostró un estadio de migración del ojo más avanzado ( $I_{EM} = 2,22$ ). De igual forma, en el día 25 el estadio más retrasado de migración se dio en el grupo EPA-L ( $I_{EM} = 3,52$ ), seguido por los grupos EPA-N y EPA-M ( $I_{EM} = 3,78$ ,  $3,98$ , respectivamente), mientras que el grupo EPA-H siguió mostrando estadios más avanzados ( $I_{EM} = 4,25$ ). Al finalizar el experimento, la migración del ojo fue

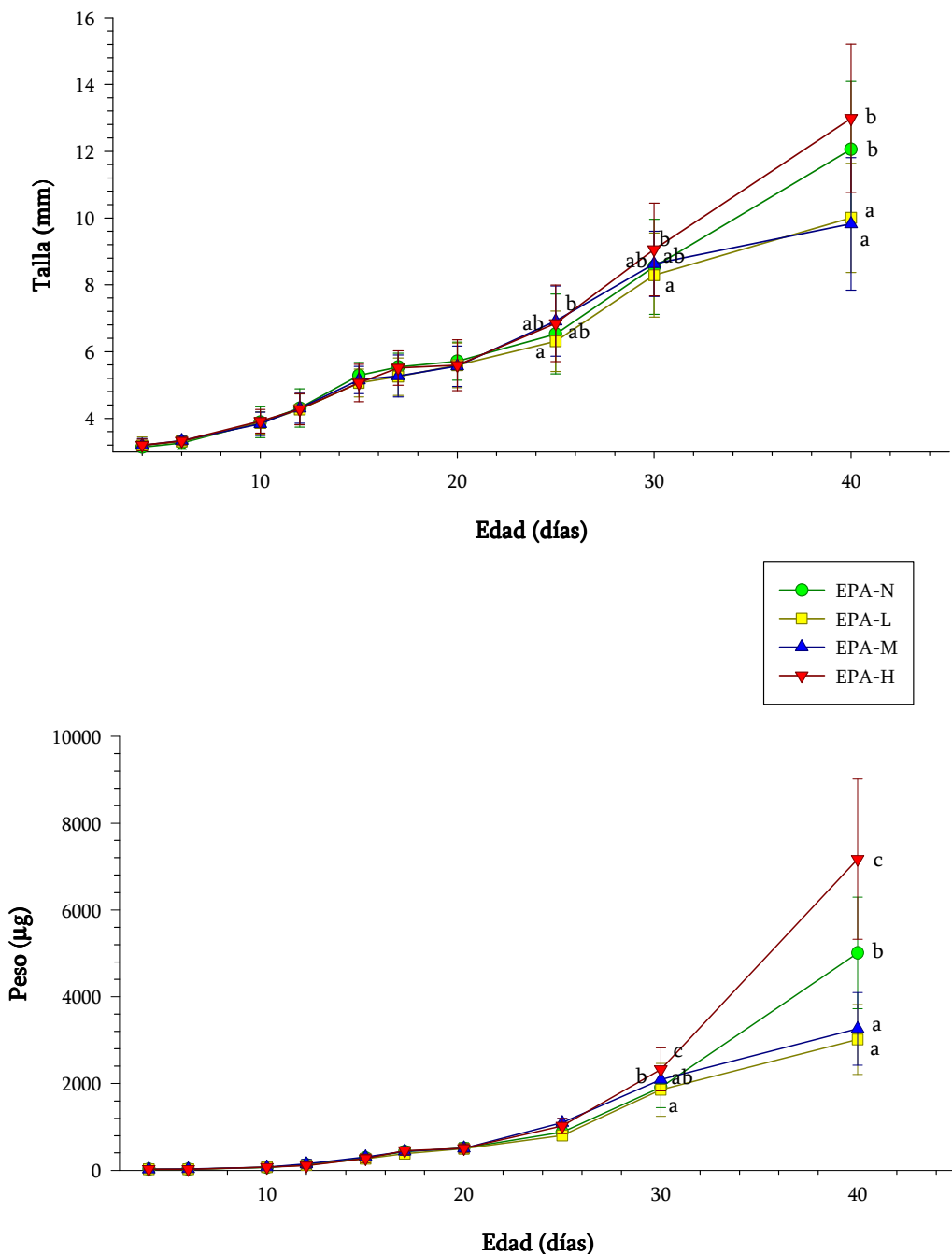


Figura 7.1. Cambios en talla y peso seco de las larvas del lenguado senegalés, a lo largo del periodo de estudio (media±SD,  $n=3$ ). Los superíndices indican diferencias significativas ( $P<0,05$ ) entre los distintos tratamientos.

*Efectos del EPA sobre el crecimiento, la supervivencia, la pigmentación y la composición en ácidos grasos de las larvas del lenguado senegalés*

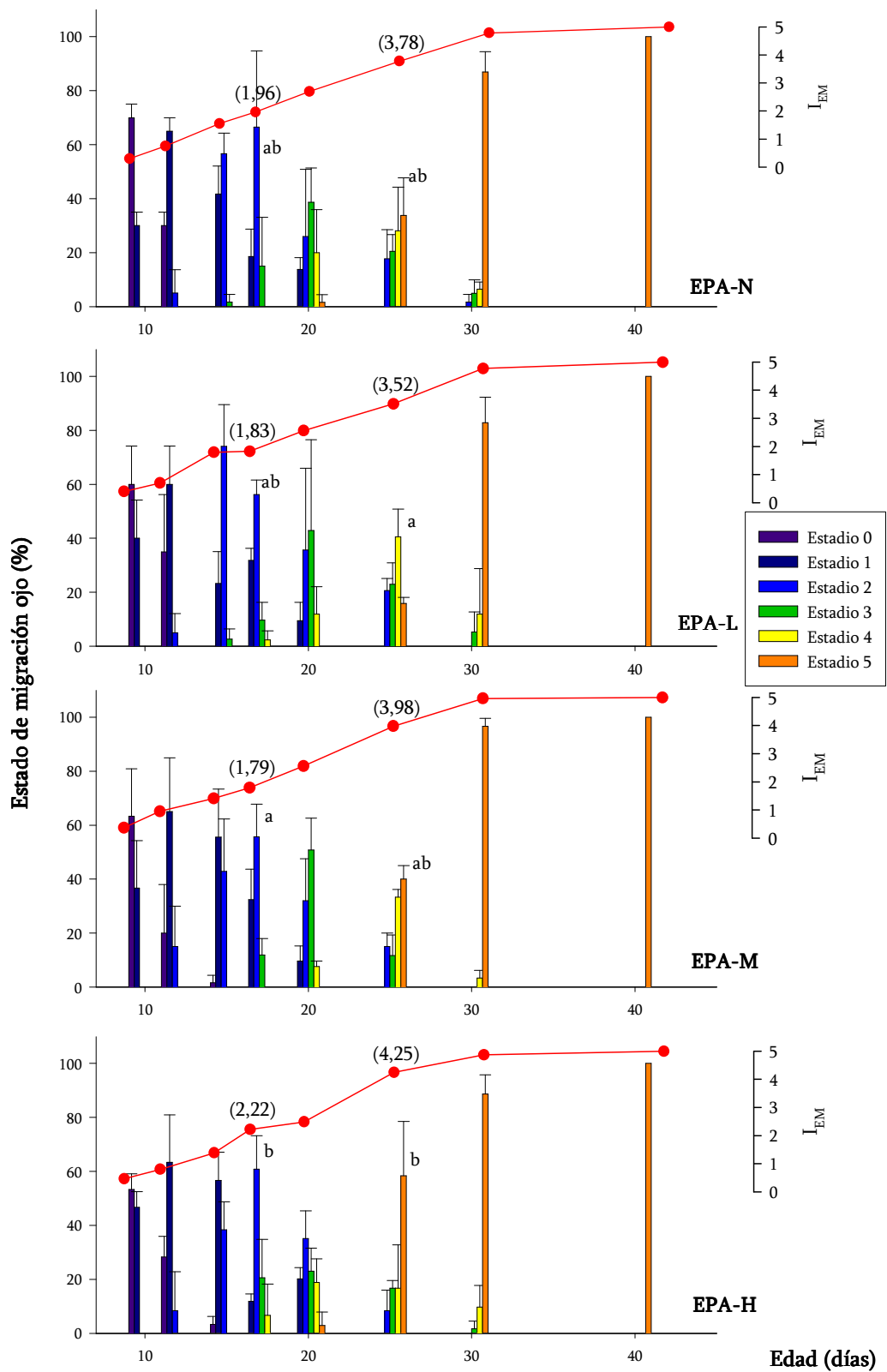


Figura 7.2. Proporciones de los distintos estadios de migración del ojo en los días de muestreo. Las barras verticales indican porcentaje $\pm$ SD de larvas en cada uno de los estadios de migración. Los distintos superíndices marcan las diferencias significativas ( $P<0,05$ ) entre los distintos tratamientos para una misma edad. El I<sub>EM</sub> se muestra como una línea por encima de las barra verticales, los valores entre paréntesis aparecen cuando se encontraron diferencias significativas ( $P<0,05$ ) entre los tratamientos para una misma edad.

---

completa y normal en todos los grupos de estudio.

### **7.3.3. Efectos de la dieta sobre la tasa de pigmentación**

Se encontraron diferencias significativas entre las tasas de pigmentación de los distintos grupos ( $P<0,0002$ ,  $F_{3,11}$ , Tabla 7.2), siendo el grupo EPA-N y EPA-L los que presentaron un mayor número de larvas malpigmentadas. Se encontró una regresión significativa y positiva entre la tasa de pigmentación y el contenido de EPA en la dieta (Pigmentación =  $81,32+0,62EPA$ ,  $P<0,001$ ,  $r^2=0,82$ ), mientras que la regresión obtenida entre la pigmentación y el contenido de ARA en la dieta fue negativa (Pigmentación =  $269,18-84,07ARA$ ,  $P<0,011$ ,  $r^2=0,53$ ). También se encontró correspondencia entre las relaciones en las que interviene el contenido en EPA de la dieta y la pigmentación (Pigmentación =  $95,21-2,79(ARA/EPA)$ ,  $P<0,012$ ,  $r^2=0,46$  y Pigmentación =  $95,25-1,42(DHA/EPA)$ ,  $P<0,05$ ,  $r^2=0,46$ ).

### **7.3.4. Efectos de la dieta sobre la composición en lípidos y ácidos grasos de los tejidos de las larvas**

Después de 40 días de alimentación con presas vivas, la composición lipídica de los cuerpos de las larvas reflejó la composición de las emulsiones utilizadas en el enriquecimiento (Tabla 7.3). No se encontraron diferencias



significativas entre los grupos, ni en la cantidad de lípidos totales ni en la cantidad de ácidos grasos totales.

La composición en ácidos grasos de las larvas reflejó la composición de las dietas. Se encontraron diferencias significativas en el total de MUFA, debido a las diferencias entre los contenidos de OA. El grupo EPA-N mostró un contenido significativamente mayor de OA que los otros tres grupos, siendo el grupo EPA-H el que mostró un contenido menor de este ácido graso. También se encontraron diferencias significativas en el total de PUFA n-6 entre el grupo EPA-N y los otros tres, debido a los altos contenidos de LA y ARA presentes en este grupo. Se encontró una regresión negativa y significativa entre el contenido de EPA en los nauplios de *Artemia* y el contenido en ARA de las larvas (Figura 7.3). El contenido total de PUFA n-3 fue significativamente diferente entre los grupos, mientras que los contenidos en LNA y EPA de las larvas fueron significativamente mayores cuando el contenido de EPA en la dieta aumentaba. El contenido de DHA de las larvas fue mayor en el grupo EPA-N, seguido de los grupos EPA-L y EPA-M. Las larvas del grupo EPA-H mostraron un contenido de DHA en el organismo significativamente menor que el de los otros grupos. Se encontró una regresión positiva y significativa entre el contenido en EPA de los nauplios de *Artemia* y el contenido en EPA de las larvas (Figura 7.3) y una regresión significativa y negativa entre el contenido en EPA de los nauplios de *Artemia* y el contenido de DHA de las larvas (Figura 7.3).

	Iniciales	EPA-N	EPA-L	EPA-M	EPA-H
Lípidos Totales (mg g <sup>-1</sup> ) (DW)	176,7±23,1	180,5±17,1	198,8±46,1	219,6±16,3	219,0±26,8
TFA (mg g <sup>-1</sup> ) (DW)	116,1±16,6	90,5±15,7	89,8±17,2	92,2±5,7	91,0±29,1
14:0	1,5±0,6	1,2±0,1 <sup>b</sup>	0,8±0,1 <sup>a</sup>	0,7±0,1 <sup>a</sup>	0,5±0,1 <sup>a</sup>
16:0	20,6±2,0	12,5±0,8	12,2±0,9	12,0±1,3	11,7±3,0
18:0	7,7±1,4	5,5±0,3	5,8±0,4	5,7±0,7	6,1±1,5
Total saturados	30,8±2,5	20,1±1,3	19,7±1,5	19,3±2,1	19,3±4,8
16:1n-7	4,5±0,7	2,1±0,1	2,4±0,1	2,6±0,2	2,8±0,7
18:1n-9	10,6±1,9	32,7±0,5 <sup>c</sup>	26,6±1,6 <sup>b</sup>	23,1±1,5 <sup>b</sup>	12,3±1,7 <sup>a</sup>
18:1n-7	3,0±0,1	6,3±0,1	7,1±0,3	7,2±0,5	4,9±4,1
20:1n-9	1,1±0,4	0,9±0,1	0,8±0,0	0,7±0,1	0,4±0,4
20:1n-7	0,6±0,2	0,2±0,0	0,2±0,0	0,2±0,0	0,2±0,0
Total monoinsaturados	21,4±3,2	43,7±0,6 <sup>c</sup>	38,0±2,2 <sup>b,c</sup>	34,6±2,3 <sup>b</sup>	21,6±5,4 <sup>a</sup>
18:2n-6	1,1±0,4	6,7±0,1 <sup>b</sup>	5,3±0,3 <sup>a</sup>	4,7±0,2 <sup>a</sup>	5,2±0,4 <sup>a</sup>
20:2n-6	0,2±0,1	0,3±0,0 <sup>c</sup>	0,3±0,0 <sup>a,b</sup>	0,2±0,0 <sup>a</sup>	0,3±0,0 <sup>b</sup>
20:3n-6	0,3±0,1	0,4±0,2	0,4±0,0	0,2±0,1	0,3±0,0
20:4n-6	3,0±0,1	4,0±0,2 <sup>b</sup>	2,7±0,4 <sup>a</sup>	2,1±0,3 <sup>a</sup>	2,0±0,1 <sup>a</sup>
Total PUFA n-6	5,6±0,5	12,2±0,5 <sup>b</sup>	9,2±0,8 <sup>a</sup>	7,8±0,5 <sup>a</sup>	8,5±0,2 <sup>a</sup>
18:3n-3	0,4±0,1	11,7±0,5 <sup>a</sup>	13,6±0,3 <sup>a,b</sup>	13,4±0,6 <sup>a,b</sup>	15,5±1,5 <sup>b</sup>
20:5n-3	5,8±2,1	1,2±0,3 <sup>a</sup>	7,0±0,9 <sup>b</sup>	12,1±1,5 <sup>c</sup>	19,3±1,1 <sup>d</sup>
22:5n-3	4,1±1,1	1,0±0,1 <sup>a</sup>	3,5±0,5 <sup>b</sup>	3,8±0,6 <sup>b</sup>	5,0±0,2 <sup>c</sup>
22:6n-3	28,1±2,5	6,5±0,4 <sup>b</sup>	5,3±0,4 <sup>a,b</sup>	4,9±0,8 <sup>a,b</sup>	4,8±0,8 <sup>a</sup>
Total PUFA n-3	41,1±1,7	24,0±1,4 <sup>a</sup>	43,1±2,9 <sup>b</sup>	38,3±3,9 <sup>b</sup>	50,6±1,0 <sup>c</sup>
Total PUFA	47,9±0,8	36,2±1,8 <sup>a</sup>	42,3±3,7 <sup>a,b</sup>	46,0±4,4 <sup>b</sup>	59,1±1,1 <sup>c</sup>
DHA/EPA	5,2±1,3	5,7±1,5 <sup>b</sup>	0,7±0,0 <sup>a</sup>	0,4±0,0 <sup>a</sup>	0,3±0,0 <sup>a</sup>
ARA/DHA	0,1±0,0	0,6±0,0 <sup>d</sup>	0,6±0,0 <sup>c</sup>	0,4±0,0 <sup>b</sup>	0,4±0,0 <sup>a</sup>
ARA/EPA	0,6±0,2	3,5±1,0 <sup>b</sup>	0,4±0,0 <sup>a</sup>	0,2±0,0 <sup>a</sup>	0,1±0,0 <sup>a</sup>

Tabla 7.3. Composición en %TFA de las larvas de lenguado senegalés, recién eclosionadas (1 dph) y en el último día de muestreo (40 dph) (media±SD,  $n = 3$ ).

Los totales incluyen algunos componentes minoritarios que no se muestran.

Los superíndices (a, b, c, d) marcan las diferencias significativas entre los tratamientos ( $P < 0,05$ ,  $F_{3,11}$ ).

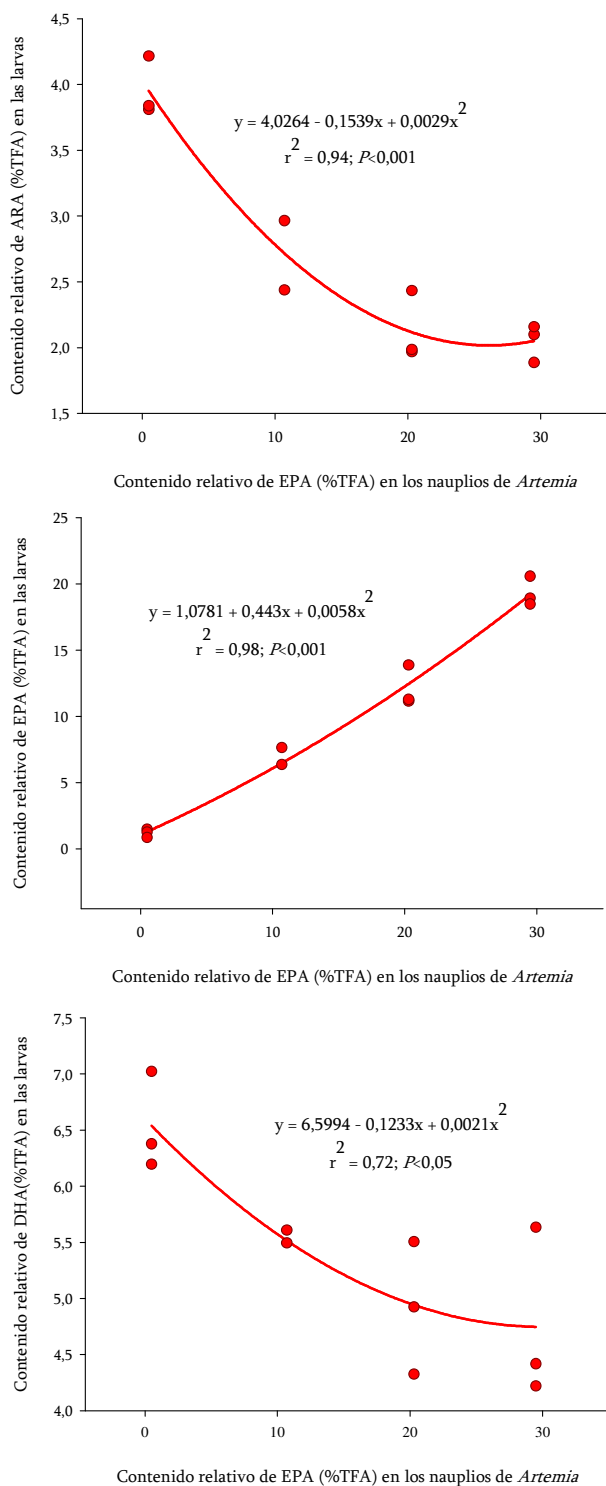


Figura 7.3. Relaciones entre el contenido de EPA en los nauplios de *Artemia* y los contenidos en ARA, EPA y DHA de las larvas del lenguado senegalés después de 40 días de cultivo (n=11).

## 7.4. Discusión

Contrariamente a lo que ocurre en estudios dosis-respuesta con otros tipos de larvas de peces marinos (Bransden et al., 2005b), en las larvas del lenguado senegalés hasta el día 40 de cultivo, no se observó una relación dosis-respuesta entre el contenido de EPA en la dieta y el crecimiento. Las larvas del lenguado senegalés son capaces de crecer y sobrevivir hasta el día 40 con contenidos nulos de EPA en la dieta. Elevados contenidos de EPA en la dieta, más del 30% TFA (33,9 mg g<sup>-1</sup>), puede que tengan un efecto patológico en las larvas y por tanto ser el motivo de la baja supervivencia observada en el grupo EPA-H (34%), esta supervivencia fue significativamente más baja que la observada en los grupos alimentados con concentraciones bajas (10% TFA) o medias (20% TFA) de EPA. En el día 17 después de la eclosión, las larvas del grupo EPA-H mostraron un estadio de desarrollo más avanzado que los otros grupos. Una hipótesis para explicar las diferencias en el crecimiento, y por consiguiente en el desarrollo entre los distintos grupos, podría ser la energía obtenida desde la dieta. Los peces obtienen la energía para crecer y para la actividad metabólica principalmente de los SFA y MUFA (16:0, OA, 20:1n-9) de la dieta, que se almacenan en los lípidos de reserva (triglicéridos) y son fácilmente catabolizados (Sargent et al., 2002). El grupo EPA-H se alimentó de nauplios de *Artemia* menos ricos en MUFA que los otros grupos, lo que puede provocar que otros ácidos grasos, incluidos el DHA y el EPA, sean usados para la obtención de energía (Villalta et al., 2005b), de este modo se obtiene una reducción en la concentración de DHA en los tejidos (Tabla 7.3). Los ácidos grasos DHA y EPA no son tan fácilmente catabolizados por la vía de la  $\beta$ -

oxidación, como lo son los SFA o los MUFA (Sargent et al., 2002). Al contrario, el alto contenido energético de los nauplios del grupo EPA-N, ricos en MUFA, especialmente en OA, podría explicar el elevado crecimiento de las larvas de este grupo al compararlas con las de los grupos EPA-L y EPA-M, que consumieron niveles más bajos de monómeros y por lo tanto dispusieron de menor energía.

En general, la composición de los tejidos de las larvas del lenguado senegalés reflejó la composición de la dieta, lo que es coherente con otros estudios llevados a cabo en larvas de peces marinos (Mourente et al., 1993; Rodríguez et al., 1994; Harel et al., 2000; Koven et al., 2001; Bransden et al., 2004, 2005b, 2005c, 2005d; Villalta et al., 2005a, 2005b). Sin embargo, en el presente capítulo, aunque las emulsiones se formularon para mantener constantes los niveles de DHA y ARA entre los grupos, como se reflejó en la composición de los nauplios de *Artemia* (Tabla 7.1), la composición de los tejidos larvarios mostró una tendencia diferente, ya que la concentración de estos ácidos grasos disminuyó a medida que la concentración de EPA en la dieta aumentaba (Figura 7.3). Mientras que el catabolismo del DHA y el ARA para obtener energía es una posible explicación, es más probable que la reducción en su contenido sea debida a las interacciones que se dan entre ácidos grasos. El desplazamiento del EPA de los tejidos por parte del ARA ha sido descrito por diversos autores (Tocher y Sargent, 1986; Bell et al., 1995a; Bessonart et al., 1999; Willey et al., 2003), y puede ser explicado por las interacciones competitivas entre estos dos ácidos grasos por la posición *sn-2* en los fosfolípidos de membrana. En el presente capítulo el contenido de EPA en los tejidos aumentó en paralelo a una clara y significativa reducción en la concentración de

ARA, un hecho que ya fue observado por Bell et al. (1989) en *Salmo salar*. También hay una aparente competición entre el EPA y el DHA, ya que las concentraciones de DHA disminuyeron aún cuando las concentraciones en la dieta se mantuvieron o incluso aumentaron, lo que sugiere una relación de competencia entre el EPA y el DHA por formar parte de los fosfolípidos. Las características moleculares de los fosfolípidos de los peces sugieren que la posición *sn*-2 estará preferentemente ocupada por el ARA, el EPA o el DHA, y cuando uno de ellos esté en exceso, dominará por encima de los otros dos HUFA y entrará preferentemente a formar parte de los fosfolípidos de membrana (Bell and Dick, 1991a, 1991b).

Los niveles más altos de EPA en la dieta provocaron las mayores acumulaciones de DPA en los tejidos. La acumulación de DPA es debida a la elongación desde el EPA y a la baja tasa de conversión de DPA a DHA, como ha sido observado en otras especies de peces marinos (Mourente y Tocher, 1994; Bell et al., 1995a; Takeuchi et al., 1996). No obstante algunos peces, especialmente de agua dulce, tienen mejores tasa de conversión de EPA a DHA que las especies marinas (Sargent et al., 1989, 1995). En este caso, el primer paso de la elongación del EPA hacia DPA lo llevan a cabo los enzimas elongasas, seguido de la conversión del DPA a DHA mediante una compleja cadena de reacciones en las que se da una elongación, una desaturación en la posición  $\Delta 6$  y un acortamiento de cadena, haciendo de este un proceso limitante. En el presente capítulo, quizá la conversión de EPA a DHA esté afectada por los elevados niveles de LNA de la dieta. Estudios en mamíferos han demostrado que elevados niveles de LNA en la dieta pueden inhibir la síntesis e incorporación de DHA a los fosfolípidos, debido a la competición entre el LNA y el 24:6n-3 por el

enzima  $\Delta 6$  desaturasa (Cleland et al., 2005). Así que probablemente la acumulación de DPA observada en los tejidos de las larvas del lenguado senegalés en este capítulo, sea debida a que las larvas no son capaces de alargar y desaturar el EPA hacia DHA a niveles significativos, y por tanto, el producto intermedio, DPA, se acumula. En el capítulo anterior se indicó que durante las primeras etapas del desarrollo de las larvas del lenguado senegalés, el DHA no es esencial, así que la acumulación que se observó en este capítulo no es un efecto fisiológico para intentar alcanzar niveles adecuados de DHA, sino que probablemente sólo refleje un aumento del sustrato disponible (EPA) a medida que el EPA va aumentando en la dieta.

Hay una correlación positiva entre el contenido de EPA en la dieta, la acumulación de EPA en los tejidos de las larvas y el grado de pigmentación. Estudios previos han indicado que la pigmentación en los peces planos está relacionada negativamente con el contenido de ARA en la dieta, así como con las relaciones ARA/EPA (Bell et al., 2003; Villalta et al., 2005a) y DHA/EPA (Reitan et al., 1994). Sargent et al. (1999b) supusieron que los eicosanoides, de los que el ARA y EPA son precursores, estaban relacionados con el proceso de pigmentación, estudios recientes han ofrecido evidencias para afirmar este supuesto (Bransden et al., 2005c). En este capítulo encontramos que las alteraciones pigmentarias observadas en los grupos EPA-N y EPA-L fueron una consecuencia del nivel de EPA en la dieta y de las relaciones ARA/EPA y DHA/EPA no óptimas. La malpigmentación es un serio problema económico en el cultivo de peces planos, los avances en los conocimientos de cómo se induce este hecho mediante la dieta pueden ofrecer mejoras para la gestión de los cultivos de estas especies.

En el presente capítulo las larvas del lenguado senegalés alimentadas sin presencia de EPA en la dieta crecieron igual que aquellas alimentadas con concentraciones más elevadas. Los perfiles de ácidos grasos observados para los tejidos de las larvas reflejaron las proporciones de las dietas, a excepción del DHA y el ARA, hecho que se explica mediante las interacciones competitivas entre los EFA. Junto con los dos capítulos anteriores sobre los requerimientos en ARA y DHA, los datos obtenidos en este capítulo muestran evidencias de que las larvas del lenguado senegalés son poco usuales al compararlas con otras especies de peces marinos, ya que durante el periodo de alimentación con presas vivas, sus requerimientos por HUFA n-3 son muy bajos. Las alteraciones pigmentarias pueden ser un grave problema económico en la comercialización de las especies de peces planos provenientes de la acuicultura, en este capítulo se muestra como pueden ser solucionados mediante un adecuado manejo nutricional de las larvas durante las etapas de desarrollo larvario.



*8. CAPÍTULO V: El ácido araquidónico, la relación ARA/EPA, el ácido estearidónico y los eicosanoides, están implicados en el albinismo inducido por la dieta.*



## **8.1. Introducción**

El ARA y el EPA son considerados esenciales para los peces marinos debido a que ambos son precursores de los eicosanoides (Sargent et al., 1999a), grupo muy diverso y complejo de moléculas altamente activas a nivel fisiológico que actúan como hormonas de acción local y están relacionadas con una gran variedad de procesos de regulación en el organismo. Los precursores de los eicosanoides son principalmente ácidos grasos desaturados de 20 carbonos, tanto n-6 como n-3, como el ácido dihogammalinolénico (20:3n-6), el ARA, el ácido eicosatetraenoico (20:4n-3) y el EPA. Los eicosanoides producidos a partir del ARA son altamente bioactivos, mientras que los producidos a partir del EPA tienen menor actividad biológica (Tocher, 2003). La proporción existente entre los ácidos grasos ARA y EPA determinará el nivel y el modo de acción de los eicosanoides. Se ha demostrado que el ARA está implicado en el aumento de la resistencia al estrés, tanto del provocado por el manejo en *S. aurata* y en *Morone saxatilis* (Koven et al., 2001), como del provocado por el cambio a un ambiente hipersalino en las larvas de *P. dentatus* (Willey et al., 2003). Por otro lado, el ARA también se ha relacionado con los problemas pigmentarios de los peces planos (Bell et al., 2003; Villalta et al., 2005b) debido a que induce un estrés bioquímico y una sobreproducción de eicosanoides (Sargent et al., 1999b), aunque esta asociación entre la producción de eicosanoides y la pigmentación no ha sido aún verificada. En mamíferos, los eicosanoides de la serie n-3 tienen un efecto antiinflamatorio, mientras que los de la serie n-6 están asociados a la inflamación.

La disminución de las capturas pesqueras junto con el riesgo derivado de la presencia de contaminantes en los aceites de pescado, ha impulsado a los científicos y a la industria a investigar el modo de extraer omega-3 desde fuentes alternativas. Así, las plantas y los microorganismos están siendo utilizados para solucionar el problema (Miller et al., 2005). En los últimos años diversos programas europeos (englobados en el proyecto FORM de la UE) han financiado estudios de sustitución de aceites y harinas de pescado por otros de origen vegetal para el engorde de peces marinos, obteniéndose buenos resultados tanto en crecimiento como en supervivencia, aunque el pescado cultivado con estas dietas tiene menos HUFA n-3 y más LA, y por lo tanto no ofrece la misma protección cardiovascular ni los mismos beneficios derivados del consumo de pescado (Izquierdo et al., 2003) y se debe someter a un recebo de al menos 3 meses con piensos formulados con harinas y aceites de pescado para recuperar estas propiedades. En el caso del cultivo larvario, no se ha contemplado el uso de aceites vegetales en la formulación de las emulsiones de enriquecimiento para presas vivas, debido a los altos requerimientos que generalmente presentan las larvas de peces marinos para los HUFA n-3. El aceite de echium es un triglicérido obtenido mediante el prensado en frío de las semillas de la planta *Echium plantagineum*. En la composición de este aceite el ácido estearidónico (18:4n-3, SDA), un ácido graso raro de la serie n-3 que puede ser elongado a EPA de un modo más efectivo que desde el LNA, se encuentra en mayor cantidad que su equivalente de la serie n-6, el ácido gamma-linolénico (18:3n-6, GLA) también abundante en este aceite que por sus características ha sido utilizado en humanos gracias a su actividad hipotrigliceridémica (Surette et al.,

2004) y terapéutica en el tratamiento de enfermedades de tipo crónico e inflamatorio (Coupland y Hebard, 2002).

Así, los principales objetivos de este capítulo son, por un lado reevaluar la importancia del ARA y de la relación ARA/EPA en la pigmentación y producción de eicosanoides en el lenguado senegalés, y por otro, estudiar el uso de un nuevo aceite vegetal para el enriquecimiento de presas vivas y observar su efecto en la pigmentación de los peces planos.

## **8.2. Material y métodos**

### **8.2.1. Emulsiones experimentales**

Para preparar las cuatro emulsiones experimentales se combinaron diferentes tipos de aceites comerciales. Los aceites utilizados fueron Neuromins<sup>®</sup> (Martek Bioscience, USA), rico en DHA, Vevodar<sup>®</sup> (DSM, Holanda), rico en ARA, el aceite de pescado purificado EPA500TG<sup>®</sup> (Croda Oleochemicals, Reino Unido), rico en EPA y el aceite proveniente de la planta borraginácea *Echium plantagineum* (Technology Crops Ltd., Braintree, Reino Unido), todos ellos se combinaron con aceite de oliva, aceite vegetal, lecitina de soja y alfa-tocoferol. Los componentes utilizados en la formulación de cada una de las emulsiones se muestran en la Tabla 8.1. Para fabricar las emulsiones, a las mezclas de aceites se les añadió una cantidad equivalente de agua destilada y se homogenizó con un Ultra-turrax T25 a alta

	ARA-L	ARA-H	Echium	Croda
Formulación (mg g <sup>-1</sup> )				
Vevodar <sup>®</sup>	0,0	300,0	300,0	300,0
Neuromins <sup>®</sup>	400,0	400,0	400,0	400,0
Aceite de oliva <sup>a</sup>	392,6	123,7	24,2	84,2
Aceite vegetal <sup>b</sup>	97,4	66,3	27,6	71,4
EPA 500TG				34,3
Aceite de echium			138,2	
Lecitina de soja	70,0	70,0	70,0	70,0
Alfa-tocoferol	40,0	40,0	40,0	40,0
Lípidos Totales (mg g <sup>-1</sup> ) (DW)	407,8	417,8	415,4	402,3
Ácidos grasos				
14:0	5,4	5,8	6,0	6,1
16:0	11,4	12,7	12,4	12,6
18:0	2,4	5,0	5,1	4,8
Total saturados	19,9	24,8	24,6	24,6
16:1n-7	0,1	0,9	0,9	0,9
18:1n-9	47,7	27,4	18,6	23,5
18:1n-7	1,9	1,2	0,7	1,0
20:1n-9	0,2	0,4	0,4	0,4
20:1n-7	0,0	0,0	0,0	0,0
Total monoinsaturados	51,1	30,1	21,0	26,0
18:2n-6	10,7	9,5	10,7	10,9
18:3n-6	0,0	1,1	2,7	1,1
20:2n-6	0,0	0,2	0,2	0,3
20:3n-6	0,0	1,4	1,4	1,4
20:4n-6	0,0	13,1	13,0	13,1
Total PUFA n-6	10,7	25,3	28,1	26,8
18:3n-3	0,7	0,4	5,1	0,5
18:4n-3	0,0	0,0	1,9	0,3
20:4n-3	0,0	0,0	0,0	0,0
20:5n-3	0,0	0,0	0,0	2,0
22:5n-3	0,1	0,1	0,1	0,3
22:6n-3	17,5	19,4	19,3	19,5
Total PUFA n-3	18,4	19,9	26,3	22,5
Total PUFA	29,1	45,2	54,4	49,3

Tabla 8.1. Formulación de las emulsiones experimentales (mg g<sup>-1</sup>) y la composición en %TFA resultante.

<sup>a</sup> Procedente de olivas de la variedad Cornicabra, D.O. Montes de Toledo

<sup>b</sup> Aceite comercial de maíz

	ARA-L	ARA-H	Echium	Croda
Lípidos Totales (mg g <sup>-1</sup> )(DW)	136,9±14,9	160,9±22,9	170,0±30,1	150,8±38,3
TFA (mg g <sup>-1</sup> )(DW)	54,9±6,9	73,0±11,3	72,7±19,7	73,0±14,0
Ácidos grasos				
14:0	1,3±0,2	1,4±0,2	1,4±0,1	1,4±0,2
16:0	10,4±0,3	9,9±0,3	10,1±0,6	9,9±0,3
18:0	5,0±0,1	4,9±0,1	5,0±0,2	4,9±0,1
Total saturados	17,5±0,3	16,9±0,5	17,3±0,9	17,1±0,6
16:1n-7	2,3±0,1 <sup>b</sup>	2,2±0,0 <sup>ab</sup>	2,2±0,1 <sup>a</sup>	2,1±0,1 <sup>a</sup>
18:1n-9	27,3±3,6 <sup>b</sup>	24,0±0,6 <sup>ab</sup>	22,7±3,7 <sup>a</sup>	22,8±0,5 <sup>a</sup>
18:1n-7	6,9±0,3 <sup>b</sup>	6,7±0,2 <sup>ab</sup>	6,5±0,4 <sup>a</sup>	6,4±0,4 <sup>a</sup>
20:1n-9	0,6±0,0 <sup>ab</sup>	0,5±0,0 <sup>ab</sup>	0,6±0,0 <sup>b</sup>	0,6±0,0 <sup>ab</sup>
20:1n-7	0,1±0,0 <sup>b</sup>	0,1±0,0 <sup>ab</sup>	0,1±0,0 <sup>ab</sup>	0,1±0,0 <sup>a</sup>
Total monoinsaturados	37,9±3,8 <sup>b</sup>	34,2±0,6 <sup>ab</sup>	32,7±4,2 <sup>a</sup>	32,6±0,4 <sup>a</sup>
18:2n-6	8,6±0,5	8,7±0,3	8,9±0,2	9,5±0,5
18:3n-6	0,6±0,4 <sup>a</sup>	0,7±0,0 <sup>a</sup>	1,1±0,4 <sup>b</sup>	0,7±0,0 <sup>ab</sup>
20:2n-6	0,2±0,0	0,3±0,0	0,3±0,0	0,3±0,0
20:3n-6	0,2±0,3 <sup>a</sup>	0,6±0,0 <sup>b</sup>	0,5±0,3 <sup>b</sup>	0,6±0,1 <sup>b</sup>
20:4n-6	1,8±2,4 <sup>a</sup>	6,0±0,2 <sup>b</sup>	5,2±2,6 <sup>b</sup>	6,4±0,3 <sup>b</sup>
Total PUFA n-6	11,4±3,4 <sup>a</sup>	16,3±0,4 <sup>b</sup>	16,1±3,3 <sup>b</sup>	17,5±0,8 <sup>b</sup>
18:3n-3	21,6±1,4 <sup>b</sup>	20,3±1,1 <sup>ab</sup>	21,4±0,8 <sup>b</sup>	19,5±1,6 <sup>a</sup>
18:4n-3	2,9±0,3 <sup>bc</sup>	2,7±0,2 <sup>ab</sup>	3,1±0,2 <sup>c</sup>	2,6±0,3 <sup>a</sup>
20:4n-3	0,5±0,1	0,5±0,1	0,5±0,0	0,5±0,1
20:5n-3	2,9±0,1 <sup>b</sup>	2,7±0,1 <sup>ab</sup>	2,7±0,1 <sup>a</sup>	3,5±0,1 <sup>c</sup>
22:5n-3	0,04±0,0 <sup>a</sup>	0,1±0,0 <sup>b</sup>	0,1±0,0 <sup>b</sup>	0,1±0,0 <sup>b</sup>
22:6n-3	4,0±0,5 <sup>a</sup>	5,6±0,3 <sup>b</sup>	5,6±1,1 <sup>b</sup>	6,1±0,5 <sup>b</sup>
Total PUFA n-3	33,2±1,5	32,5±1,2	34,0±1,9	32,9±1,6
Total PUFA	44,6±4,0 <sup>a</sup>	48,9±0,9 <sup>ab</sup>	50,1±5,1 <sup>b</sup>	50,4±0,9 <sup>b</sup>
ARA / EPA	0,64±0,92 <sup>a</sup>	2,21±0,10 <sup>b</sup>	1,95±0,96 <sup>b</sup>	1,81±0,11 <sup>b</sup>

Tabla 8.2. Composición en %TFA de la *Artemia* tras 18 h de enriquecimiento (media±SD, n=6).

Los valores en una misma fila pero con superíndices diferentes denotan diferencias significativas entre ellos ( $P < 0,05$ ,  $F_{3,11}$ ).

velocidad durante 60 s. Las emulsiones se almacenaron en jeringas de plástico a 4 °C, procurando que no quedara aire residual en su interior.

### **8.2.2. Enriquecimiento de las presas vivas**

Los rotíferos se enriquecieron a 20 °C en tanques de 10 l a una densidad de 500 rotíferos ml<sup>-1</sup> durante 12 h, usando una concentración de cada una de las emulsiones de 0,1 g l<sup>-1</sup>. Antes de ser suministrados a las larvas, los rotíferos fueron lavados con abundante agua de mar y agua dulce.

Los nauplios de *Artemia* (cepa EG, INVE) se eclosionaron 6 h antes del enriquecimiento. El enriquecimiento se realizó en tanques de 10 l durante 18 h a 26 °C, a una densidad de 100 nauplios ml<sup>-1</sup> y con una concentración de la emulsión de 0,6 g l<sup>-1</sup>. Los nauplios también fueron lavados con agua de mar y agua dulce antes de ser suministrados a las larvas. A partir del día 20 de la eclosión de las larvas, cuando éstas pasaron a tener una vida bentónica, se suministraron metanauplios enriquecidos y congelados previamente a -20 °C.

Para el análisis de lípidos, tanto los nauplios de *Artemia* como los rotíferos se muestrearon dos veces durante el periodo de estudio.

### **8.2.3. Cultivo larvario**

Las larvas de lenguado senegalés fueron donadas por el Instituto Español de Oceanografía de Santander y transportadas por carretera hasta las instalaciones del CA-IRTA. Las larvas se distribuyeron en 12 tanques de malla (150 µm de poro) de 35 l de capacidad, a una densidad de 50 larvas l<sup>-1</sup>. Los 12 tanques se distribuyeron en cuatro tanques mayores de 1500 l (a razón de 3 en cada uno), conectados a una unidad de recirculación (Carbó et al., 2003) que



aseguró la misma calidad de agua para todos los tanques durante todo el periodo de estudio. La temperatura del agua se mantuvo a  $19\pm 0,6$  °C y la salinidad a  $35\pm 0,2$  g l<sup>-1</sup>, las condiciones de fotoperiodo fueron de 18:6 h (L:O) para todos los tanques de cultivo. Las larvas se alimentaron con rotíferos desde el día 3 al día 9 después de la eclosión, a una densidad de 10 rotíferos ml<sup>-1</sup> y con metanauplios de *Artemia* desde el día 5 al día 40 después de la eclosión. La ración de *Artemia* se ajustó al 70% del peso seco corporal de las larvas entre los días 5 y 15, al 20% entre los días 16 y 25, al 15% entre los días 26 y 30 y al 7,5% entre los días 31 y 40 a fin de evitar la presencia de metanauplios desenriquecidos en los tanques. Las presas vivas se distribuyeron dos veces al día. Los tanques se mantuvieron en una renovación diaria del 200%.

Cuando las larvas empezaron a migrar hacia el fondo de los tanques, la *Artemia* fresca se sustituyó por *Artemia* congelada, siguiendo el método de Morais et al. (2005).

La longitud estándar y el peso seco se midieron en los días 1, 4, 6, 10, 12, 15, 20, 30 y 40 después de la eclosión. En cada uno de ellos se muestrearon 20 larvas que se sacrificaron con una concentración letal de MS-222 (1000 mg l<sup>-1</sup>). La longitud se midió usando una lupa de disección (Nikon SMZ800) y un analizador de imágenes (Analysis, SIS GmbH, Alemania). Para la determinación del peso seco las larvas se lavaron con agua destilada para eliminar los restos de sal y se mantuvieron durante 24 h a 60 °C. La determinación del estadio de migración del ojo durante la metamorfosis se llevó a cabo mediante las pautas descritas por Fernández-Díaz et al. (2001), calculándose el porcentaje de larvas de la misma edad en cada uno de los estadios de migración así como el I<sub>EM</sub> (Solbakken et al., 1999).

La supervivencia y el patrón de pigmentación se determinaron al final del periodo experimental (40 dph).

#### **8.2.4. Análisis bioquímico**

Para el análisis de la composición bioquímica se muestrearon 20 larvas de cada tanque a los 40 días, conservándose en C:M (2:1, v:v) a -20 °C hasta su análisis. Para el análisis de eicosanoides, y si estaban presentes en cantidad suficiente, 10 larvas no pigmentadas y 10 larvas pigmentadas de cada uno de los tanques se conservaron en solución de Hank's (HBSS, Sigma) a la que se habían añadido 15% de etanol y ácido fórmico (2 M) para reducir el pH y prevenir el metabolismo residual de las prostaglandinas (Powell, 1982), conservándose a -20 °C hasta su análisis. La extracción y purificación de las prostaglandinas se realizó siguiendo la técnica de Bell et al. (1994), seguido de su análisis mediante inmunoensayo enzimático (EIA), utilizando los kits comerciales para prostaglandina E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>, Cayman Chemical, USA) y F<sub>2</sub> (PGF<sub>2</sub>, Cayman Chemical, USA). Los valores se expresan en nanogramos (ng) por gramo de materia seca (DW).

Los lípidos totales de las presas vivas enriquecidas y de los tejidos larvarios se extrajeron en C:M utilizando el método de Folch et al. (1957), se evaporaron bajo flujo de nitrógeno y se desecaron durante toda la noche en vacío, para más tarde cuantificarse gravimétricamente. Los lípidos totales se almacenaron a -20 °C en C:M (2:1, v:v) a una concentración de 10 mg ml<sup>-1</sup>.

La transmetilación catalizada por ácido se llevó a cabo mediante el método de Christie (1982). Los ésteres metílicos se extrajeron dos veces utilizando isohexano : dietil eter (1:1, v:v), se purificaron en placas de TLC y

posteriormente fueron analizados por cromatografía gas-líquido. Los ácidos grasos se identificaron mediante comparación con un estándar conocido (Supelco Inc., España) y se cuantificaron mediante la comparación con la respuesta de un estándar interno (17:0) añadido antes de la transmetilación.

### **8.2.5. Estadística**

La variación de los valores se muestra como la desviación estándar (SD) de la media de tres réplicas. Las diferencias entre las medias se determinaron mediante el análisis de la variancia de una vía con un nivel de significación de 0,05. Para la comparación entre las medias se utilizó el test de Tukey. Antes del análisis estadístico, los valores expresados en porcentajes se transformaron mediante el arcoseno del valor porcentual (Sokal y Rohlf, 1995). Para el análisis estadístico se utilizó el paquete Statgraphics (Microsoft, Inc.).

## **8.3. Resultados**

### **8.3.1. Perfil de ácidos grasos de las emulsiones y de la *Artemia***

La composición en ácidos grasos de las emulsiones fue la esperada, tal como muestra la Tabla 8.1. La emulsión ARA-L contenía altos niveles de LA y DHA, pero no se encontró ARA en su composición. Las emulsiones ARA-H, Echium y Croda contenían la misma cantidad de ARA y DHA, y solo varió la cantidad de SDA en la emulsión Echium y la cantidad de EPA en la emulsión Croda. Sin embargo, una vez enriquecidos los nauplios se observaron diferencias en el contenido total de MUFA, que fue mayor en los nauplios del grupo ARA-L

	ARA-L Fresca	ARA-L Congelada	ARA-H Fresca	ARA-H Congelada	Echium Fresca	Echium congelada	Croda Fresca	Croda Congelada
Lípidos Totales (mg g <sup>-1</sup> ) (DW)	142,35±15,84	133,22±16,48	173,59±18,71	152,39±24,76	175,35±49,95	166,47±22,75	136,22±61,70	160,49±25,86
TFA (mg g <sup>-1</sup> ) (DW)	51,24±1,63	57,42±8,42	77,56±10,71	70,00±12,86	69,08±35,00	75,10±11,87	79,88±5,53	68,49±17,30
14:0	1,33±0,21	1,34±0,17	1,42±0,26	1,38±0,11	1,45±0,12	1,41±0,05	1,47±0,28	1,41±0,07
16:0	10,24±0,36	10,44±0,18	10,12±0,46	9,85±0,08	10,53±0,90	9,72±0,01	9,86±0,46	9,90±0,14
18:0	5,11±0,13	4,99±0,03	4,97±0,06	4,95±0,06	5,13±0,21	4,94±0,16	4,93±0,22	4,96±0,04
Total saturados	17,47±0,35	17,51±0,35	17,21±0,81	16,83±0,11	18,04±1,31	16,74±0,25	17,10±1,24	17,08±0,09
16:1n-7	2,29±0,10	2,28±0,03	2,23±0,02	2,17±0,04	2,26±0,17	2,11±0,04	2,11±0,10	2,10±0,10
18:1n-9	24,50±4,59	29,18±1,44	23,73±0,47	24,23±0,66	25,12±5,84	21,06±0,30	22,79±0,93	22,74±0,35
18:1n-7	6,90±0,63	7,02±0,18	6,84±0,25	6,57±0,09	6,72±0,53	6,35±0,16	6,27±0,18	6,53±0,54
20:1n-9	0,59±0,00	0,55±0,02	0,50±0,04	0,57±0,03	0,58±0,05	0,60±0,01	0,58±0,01	0,55±0,03
20:1n-7	0,12±0,02	0,11±0,01	0,10±0,00	0,10±0,00	0,11±0,00	0,11±0,00	0,11±0,00	0,10±0,01
Total monoinsaturados	35,06±5,36	39,83±1,25	34,04±0,65	34,26±0,62	35,47±6,57	30,83±0,28	32,45±0,58	32,61±0,25
18:2n-6	8,59±0,70	8,61±0,54	8,68±0,33	8,75±0,28	8,81±0,01	9,03±0,23	9,38±0,88	9,50±0,39
18:3n-6	0,84±0,54	0,42±0,02	0,74±0,04	0,72±0,01	0,82±0,56	1,25±0,02	0,73±0,02	0,75±0,06
20:2n-6	0,25±0,04	0,20±0,01	0,27±0,01	0,29±0,01	0,26±0,08	0,29±0,01	0,30±0,01	0,28±0,02
20:3n-6	0,38±0,41	0,11±0,04	0,57±0,02	0,60±0,03	0,33±0,40	0,64±0,03	0,64±0,07	0,63±0,07
20:4n-6	3,39±3,84	0,67±0,01	5,86±0,07	6,11±0,22	3,41±3,84	6,45±0,12	6,37±0,30	6,39±0,34
Total PUFA n-6	13,45±5,53	10,02±0,55	16,13±0,27	16,47±0,52	13,63±4,89	17,66±0,39	17,42±1,22	17,54±0,81
18:3n-3	22,18±1,07	21,13±1,62	20,51±1,29	20,11±1,12	21,20±1,20	21,59±0,67	19,57±2,76	19,42±1,14
18:4n-3	3,13±0,07	2,87±0,30	2,77±0,22	2,64±0,18	2,99±0,31	3,10±0,14	2,60±0,48	2,54±0,12
20:4n-3	0,56±0,08	0,53±0,07	0,51±0,07	0,50±0,05	0,52±0,03	0,50±0,04	0,53±0,09	0,49±0,02
20:5n-3	2,82±0,21	2,87±0,13	2,74±0,08	2,71±0,04	2,70±0,09	2,69±0,08	3,57±0,17	3,49±0,04
22:5n-3	0,04±0,06	0,04±0,04	0,08±0,01	0,09±0,00	0,08±0,03	0,10±0,01	0,12±0,01	0,11±0,01
22:6n-3	4,64±1,62	4,79±0,48	5,42±0,03	5,77±0,28	4,75±1,49	6,16±0,20	6,03±0,52	6,12±0,65
Total PUFA n-3	34,02±0,18	32,64±1,87	32,63±1,74	32,44±1,24	32,86±3,00	34,76±0,76	33,02±3,04	32,76±0,59
Total PUFA	47,47±5,72	42,66±1,51	48,75±1,47	48,91±0,73	46,49±7,89	52,43±0,48	50,45±1,82	50,31±0,22
ARA / EPA	1,26±1,46	0,23±0,01	2,14±0,04	2,25±0,11	1,28±1,46	2,40±0,11	1,79±0,17	1,83±0,08

Tabla 8.3. Composición en %TFA de los nauplios de *Artemia* frescos y congelados enriquecidos en cada una de las emulsiones experimentales (media±SD,  $n = 3$ ).

y en los contenidos de DPA, ARA y DHA, que fueron menores en el grupo ARA-L. También se encontraron diferencias significativas en los contenidos de SDA y de GLA, que fueron mayores en los nauplios del grupo Echium. Los nauplios del grupo Croda presentaron un contenido en EPA significativamente mayor que los otros grupos. La composición en %TFA de los nauplios de *Artemia* tras el enriquecimiento se muestra en la Tabla 8.2.

No se observaron diferencias significativas entre los nauplios de *Artemia* frescos y los congelados (Tabla 8.3).

### **8.3.2. Efectos sobre las larvas**

En la Tabla 8.4 se muestran los resultados de crecimiento en talla y peso seco, así como los porcentajes de supervivencia y pigmentación de los juveniles tras 40 días de alimentación con cada una de las dietas experimentales. Se observó un crecimiento mayor, tanto en talla como en peso, en las larvas alimentadas con nauplios de *Artemia* enriquecidos con las emulsiones Echium y Croda. No se observaron diferencias significativas en el índice de supervivencia, pero si en la tasa de pigmentación, que fue menor para los grupos ARA-H y Croda e intermedia para el grupo Echium, mientras que el grupo ARA-L mostró una pigmentación normal, encontrándose un único individuo no pigmentado que se utilizó para el análisis de eicosanoides. El  $I_{EM}$  fue similar para todos los grupos a lo largo del desarrollo. En la Figura 8.1 se representan los valores del  $I_{EM}$  para cada grupo experimental.

	ARA-L	ARA-H	Echium	Croda
Talla (mm)	9,53±0,81 <sup>b</sup>	10,13±0,92 <sup>b</sup>	11,62±1,48 <sup>a</sup>	10,92±1,65 <sup>a</sup>
Peso seco (mg)	2,29±0,27 <sup>c</sup>	2,61±0,27 <sup>c</sup>	4,05±0,45 <sup>a</sup>	3,43±0,45 <sup>b</sup>
Supervivencia (%)	26,1±21,0	30,3±25,8	19,2±9,6	47,5±1,6
Pigmentación (%)	100±0,0 <sup>a</sup>	26,8±9,1 <sup>c</sup>	64,4±6,7 <sup>b</sup>	26,7±1,6 <sup>c</sup>

Tabla 8.4. Crecimiento, supervivencia y pigmentación de las larvas del lenguado senegalés después de 40 días de haber sido alimentadas con nauplios de *Artemia* enriquecidos en las emulsiones experimentales (media±SD,  $n=3$ ).

Los superíndices indican diferencias significativas entre los grupos ( $P<0,05$ ).

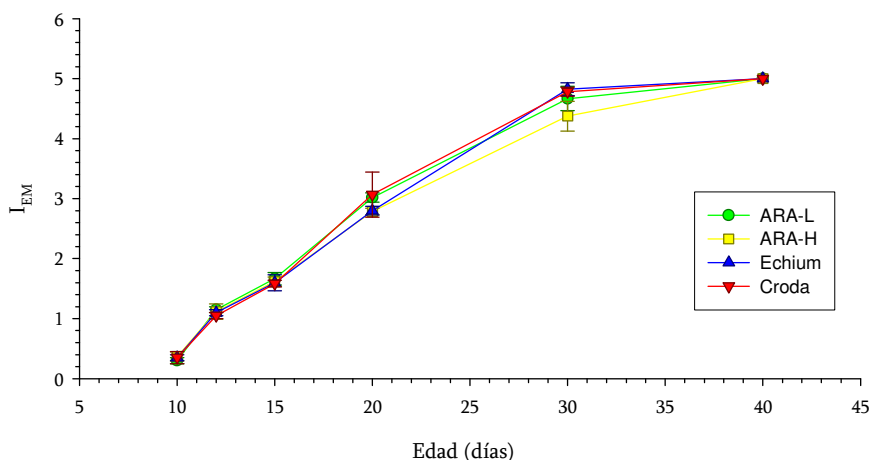


Figura 8.1. Cambios en el  $I_{EM}$  para cada uno de los grupos (media±SD,  $n=3$ ). No se representan superíndices debido a que no se encontraron diferencias significativas entre los grupos.

### 8.3.3. Bioquímica larvaria

La composición en ácidos grasos de las larvas reflejó la composición de la dieta de la que se alimentaron durante el periodo experimental (Tabla 8.5). Las larvas del grupo ARA-L mostraron un contenido significativamente menor de ARA, PUFA n-6 totales y DHA, y un contenido significativamente mayor de

LA, 20:4n-3, EPA, DPA y PUFA n-3 totales. Los grupos ARA-H, Echium y Croda mostraron contenidos similares en ARA y DHA. Las diferencias significativas entre estos tres grupos se encontraron en el contenido de LNA, 20:3n-6 y SDA que fue mayor para el grupo Echium y en el contenido de EPA y DPA que fue mayor en el grupo Croda. También entre ellos tres, los contenidos totales de PUFA n-3 y n-6 fueron significativamente mayores en los grupos Echium y Croda. La relación ARA/EPA fue significativamente menor para el grupo ARA-L y mayor para el grupo Echium, mientras que los grupos ARA-H y Croda mostraron valores intermedios.

Se analizó la producción de PG (PGE y PGF) tanto en el caso de individuos pigmentados como en el caso de individuos no pigmentados. En algunos tratamientos, grupos ARA-L y Echium, los pocos individuos no pigmentados que se detectaron se utilizaron íntegramente para este análisis (sólo 1 individuo para el grupo ARA-L). Para ambos tipos de PG, la mayor producción se detectó en individuos no pigmentados, a excepción del grupo ARA-H, en el que fueron los individuos pigmentados los que presentaron una mayor producción. En el caso de la PGF no se obtuvieron diferencias significativas entre los individuos albinos y pigmentados debido a la alta variabilidad en los resultados (Tabla 8.6, Figura 8.2). Cuando se consideraron todos los individuos, pigmentados y no pigmentados en un solo grupo, la influencia de la dieta sobre la producción de PG fue notoria, de tal manera que los peces de los grupos ARA-L y Echium mostraron una menor producción de ambos tipos de prostaglandinas, PGE y PGF, en comparación a los resultados obtenidos para los grupos ARA-H y Croda (Tabla 8.6). Asimismo se observó una clara relación positiva entre la producción de PG por parte del pez y el contenido de ARA en

la dieta, como se puede observar en la Figura 8.2, de manera que a mayor contenido de ARA en la dieta, se observó mayor producción de PG lo que condujo a una mayor producción de individuos anormalmente pigmentados.

Finalmente, se verificó una correlación linear y significativa entre el contenido de ARA (expresado en %TFA) y la relación ARA/EPA en la dieta y los resultados finales de pigmentación (Figura 8.3), en este caso se tomaron no sólo los resultados obtenidos en este capítulo sino también los de los capítulos 5 y 7.

## **8.4 Discusión**

El crecimiento y la supervivencia larvaria obtenidos en este capítulo son inferiores a los resultados obtenidos en experimentos anteriores, tal vez debido al distinto origen de las larvas utilizadas (en este caso procedentes de Santander) o a la calidad inicial de las mismas, aunque en todos los casos provinieron de puestas naturales de reproductores mantenidos en cautividad. En los capítulos anteriores las larvas se alimentaron de rotíferos y nauplios de *Artemia* frescos desde el inicio del cultivo larvario hasta el final del periodo experimental. En el presente capítulo se utilizaron nauplios de *Artemia* congelados para alimentar a las larvas desde el día 20 hasta el día 40 después de la eclosión, y aunque los peces mostraron una actividad positiva a la hora de alimentarse, el uso de presas congeladas quizá haya contribuido a la menor tasa de crecimiento observada en este capítulo. La calidad de los nauplios en cuanto a la composición en ácidos grasos no se vio afectada por la congelación y su eficacia para alimentar a peces



	ARA-L	ARA-H	Echium	Croda
Lípidos Totales (mg g <sup>-1</sup> )(DW)	137,2±1,7 <sup>b</sup>	110,3±12,3 <sup>a</sup>	134,4±3,2 <sup>ab</sup>	138,9±16,2 <sup>b</sup>
TFA (mg g <sup>-1</sup> )(DW)	34,6±0,3	40,0±4,4	36,2±1,0	40,2±4,1
Ácidos grasos				
14:0	0,9±0,0	0,9±0,0	1,0±0,0	0,9±0,0
16:0	12,0±0,2 <sup>b</sup>	11,7±0,1 <sup>ab</sup>	11,3±0,3 <sup>a</sup>	11,4±0,3 <sup>a</sup>
18:0	7,2±0,2	7,1±0,1	6,8±0,4	6,8±0,2
Total saturados	20,9±0,5	20,7±0,2	20,0±0,9	20,1±0,6
16:1n-7	1,8±0,1 <sup>b</sup>	1,7±0,1 <sup>a</sup>	1,7±0,1 <sup>ab</sup>	1,7±0,0 <sup>a</sup>
18:1n-9	23,8±0,1 <sup>d</sup>	20,5±0,3 <sup>c</sup>	18,4±0,4 <sup>a</sup>	19,5±0,3 <sup>b</sup>
18:1n-7	6,9±0,0 <sup>b</sup>	6,4±0,1 <sup>a</sup>	6,4±0,1 <sup>a</sup>	6,3±0,1 <sup>a</sup>
20:1n-9	0,8±0,0 <sup>b</sup>	0,7±0,0 <sup>a</sup>	0,7±0,0 <sup>a</sup>	0,7±0,0 <sup>a</sup>
20:1n-7	0,4±0,0 <sup>c</sup>	0,3±0,0 <sup>a</sup>	0,3±0,0 <sup>ab</sup>	0,3±0,0 <sup>b</sup>
Total monoinsaturados	35,2±0,0 <sup>d</sup>	30,7±0,4 <sup>c</sup>	28,7±0,5 <sup>a</sup>	29,6±0,4 <sup>b</sup>
18:2n-6	8,5±0,0 <sup>c</sup>	7,3±0,1 <sup>a</sup>	7,6±0,1 <sup>b</sup>	7,7±0,1 <sup>b</sup>
18:3n-6	0,4±0,0 <sup>a</sup>	0,6±0,0 <sup>b</sup>	0,9±0,0 <sup>c</sup>	0,6±0,0 <sup>b</sup>
20:2n-6	0,4±0,0 <sup>b</sup>	0,4±0,0 <sup>a</sup>	0,4±0,0 <sup>b</sup>	0,4±0,0 <sup>b</sup>
20:3n-6	0,4±0,0 <sup>a</sup>	0,7±0,0 <sup>b</sup>	0,8±0,0 <sup>d</sup>	0,7±0,0 <sup>c</sup>
20:4n-6	1,8±0,0 <sup>a</sup>	9,1±0,2 <sup>b</sup>	9,0±0,3 <sup>b</sup>	9,1±0,1 <sup>b</sup>
Total PUFA n-6	11,6±0,1 <sup>a</sup>	19,1±0,2 <sup>b</sup>	20,0±0,1 <sup>c</sup>	19,8±0,2 <sup>c</sup>
18:3n-3	13,3±0,2 <sup>b</sup>	11,9±0,3 <sup>a</sup>	13,0±0,2 <sup>b</sup>	11,8±0,1 <sup>a</sup>
18:4n-3	1,4±0,0 <sup>b</sup>	1,3±0,1 <sup>a</sup>	1,5±0,0 <sup>c</sup>	1,3±0,0 <sup>a</sup>
20:4n-3	0,8±0,0 <sup>b</sup>	0,6±0,0 <sup>a</sup>	0,6±0,0 <sup>a</sup>	0,6±0,0 <sup>a</sup>
20:5n-3	2,4±0,1 <sup>d</sup>	1,4±0,0 <sup>b</sup>	1,3±0,0 <sup>a</sup>	1,7±0,0 <sup>c</sup>
22:5n-3	2,2±0,0 <sup>c</sup>	1,8±0,1 <sup>a</sup>	1,7±0,0 <sup>a</sup>	2,0±0,1 <sup>b</sup>
22:6n-3	10,9±0,2 <sup>a</sup>	11,3±0,2 <sup>b</sup>	11,6±0,2 <sup>b</sup>	12,0±0,2 <sup>c</sup>
Total PUFA n-3	32,3±0,4 <sup>d</sup>	29,5±0,1 <sup>a</sup>	31,3±0,6 <sup>c</sup>	30,5±0,2 <sup>b</sup>
Total PUFA	43,9±0,5 <sup>a</sup>	48,6±0,2 <sup>b</sup>	51,3±0,4 <sup>d</sup>	50,3±0,4 <sup>c</sup>
ARA / EPA	0,8±0,0 <sup>a</sup>	6,6±0,2 <sup>c</sup>	6,9±0,2 <sup>c</sup>	5,3±0,1 <sup>b</sup>

Tabla 8.5. Composición en %TFA de las larvas del lenguado senegalés después de 40 días de alimentación con *Artemia* enriquecida con las emulsiones experimentales (media±SD, n=3).

Los valores en una misma fila pero con superíndices diferentes denotan diferencias significativas entre ellos ( $P < 0,05$ ,  $F_{3,11}$ ).

	PGE <sub>2</sub> (ng g <sup>-1</sup> DM)			PGF <sub>2</sub> (ng g <sup>-1</sup> DM)		
	No pigmentados	Pigmentados	Totales	No pigmentados	Pigmentados	Totales
ARA-L	20,99 <sup>a*</sup>	5,12±1,25 <sup>a</sup>	10,41±9,21 <sup>a</sup>	23,08 <sup>a*</sup>	6,36±1,06 <sup>a</sup>	11,94±9,68 <sup>a</sup>
ARA-H	49,36±18,47 <sup>ab</sup>	62,09±4,31 <sup>b</sup>	55,73±13,19 <sup>b</sup>	93,72±19,96 <sup>a</sup>	109,95±97,42 <sup>a</sup>	101,83±58,17 <sup>bc</sup>
Echium	14,22 <sup>a*</sup>	8,20±5,40 <sup>a</sup>	10,21±5,16 <sup>a</sup>	38,67 <sup>a*</sup>	23,06±8,12 <sup>a</sup>	28,26±10,69 <sup>ab</sup>
Croda	84,04±9,95 <sup>b</sup>	55,23±19,10 <sup>b</sup>	69,64±20,85 <sup>b</sup>	185,07±63,03 <sup>a</sup>	125,29±57,56 <sup>a</sup>	162,57±63,14 <sup>c</sup>

Tabla 8.6. Producción de prostaglandinas (en ng g<sup>-1</sup> de materia seca, DM) de los peces pigmentados y no pigmentados para los distintos tipos de alimentación.

Los superíndices indican diferencias significativas entre los distintos tratamientos ( $P < 0,05$ ,  $n=3$  muestras por grupo y de 1 a 10 peces por muestra).

\*Se analizó una sola muestra debido a la falta de individuos.

metamorfosados que ya han migrado hacia el fondo de los tanques es adecuada ya que gracias a la congelación se impide el metabolismo de los nauplios y los posibles cambios en su composición lipídica (Navarro et al., 1999).

La composición en ácidos grasos de los nauplios fue diferente a la de las emulsiones. Si la composición de los nauplios hubiera reflejado la composición de las emulsiones, el contenido en SDA hubiera sido mayor, el contenido en EPA menor y se hubieran detectado mayores diferencias entre los grupos. Sin embargo, y como es habitual en el enriquecimiento de *Artemia*, el contenido en EPA aumentó en todos los grupos y se situó entorno al 2,5-3% TFA, incluso cuando este ácido graso no estuvo presente en la emulsión, hecho probablemente debido al acortamiento de la cadena desde el DHA. Como consecuencia, no se observaron las diferencias esperadas entre los grupos en la relación ARA/EPA, sino que en los grupos ARA-H, Echium y Croda el resultado fue similar y solo el grupo ARA-L, en el que no se suministró ARA en la alimentación mostró la relación ARA/EPA esperada.

*El ARA, el ratio ARA/EPA, el SDA y los eicosanoides están implicados en el albinismo inducido por la dieta del lenguado senegalés*

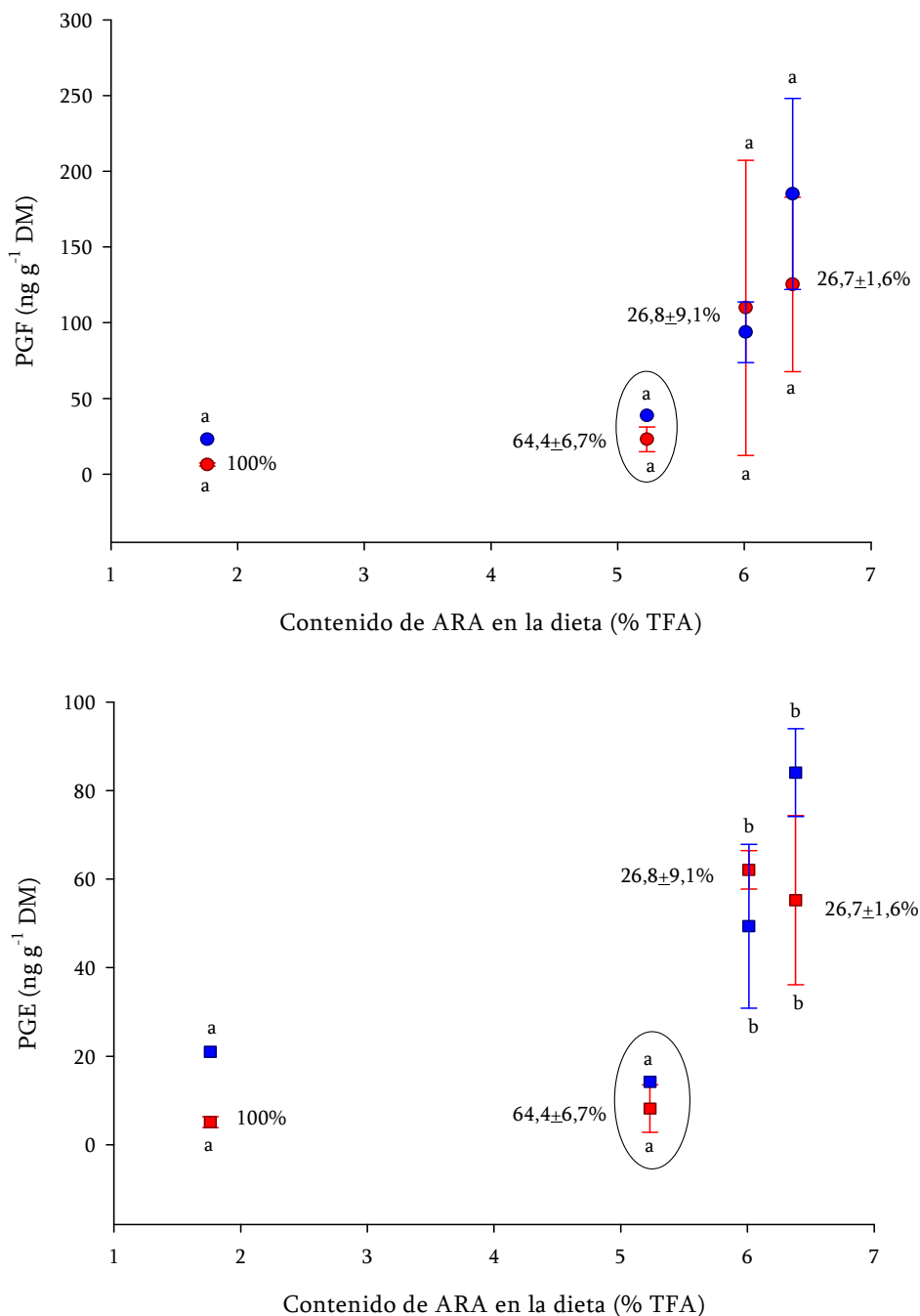


Figura 8.2. Producción de prostaglandinas por los peces no pigmentados (símbolos azules) y por los pigmentados (símbolos rojos) en relación con el contenido de ARA en la dieta. Las letras indican diferencias significativas entre los grupos y tipos de larvas. Los datos representan los índices de pigmentación al final del periodo experimental. Los resultados para el grupo *Echium* se muestran en el interior de los círculos.

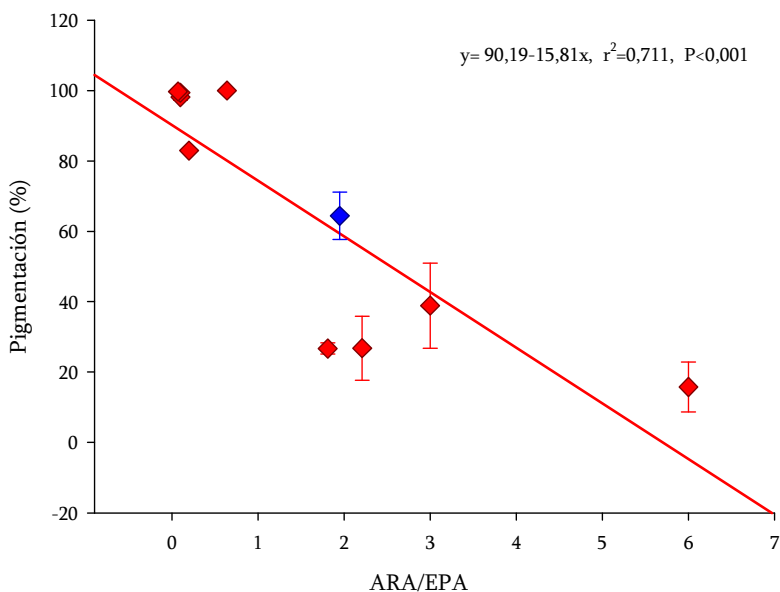
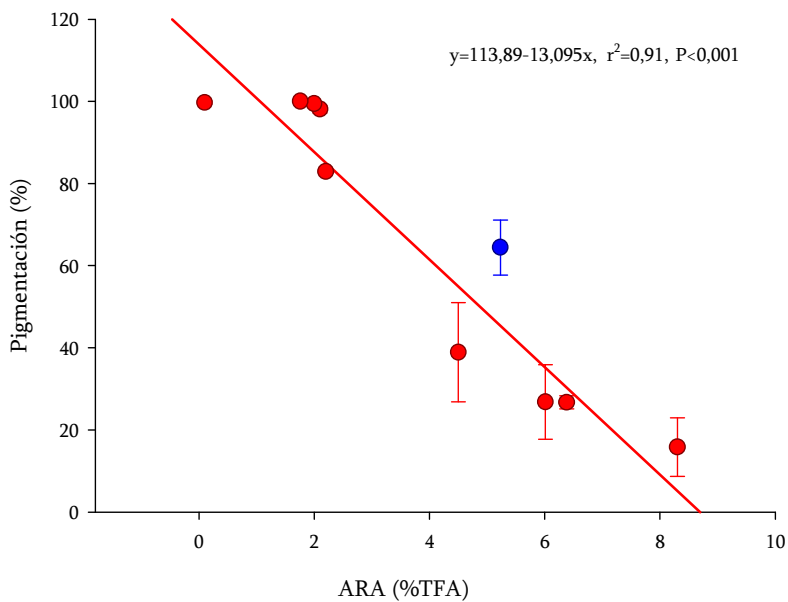


Figura 8.3. Regresiones entre el contenido de ARA y ARA/EPA en la dieta y el índice de pigmentación. Los valores representados provienen de los resultados de este capítulo y del capítulo 5 (n=10). El símbolo azul indica el resultado obtenido para el grupo Echium.

El principal efecto de las dietas experimentales sobre las larvas del lenguado senegalés se observó en las tasas de crecimiento y en los índices de pigmentación de los distintos grupos. Los peces del grupo ARA-L mostraron una menor tasa de crecimiento y una mayor proporción de individuos pigmentados, contrastando con el efecto sobre los grupos ARA-H y Croda, en los que sus individuos mostraron tasas de crecimiento más elevadas y mayores proporciones de individuos no pigmentados. Los resultados en cuanto a pigmentación tienen similitudes a los obtenidos en el capítulo 5 y a los obtenidos por diversos autores en otras especies de peces planos (Estévez et al., 1999; Copeman et al., 2002). Un exceso de ARA en la alimentación de las larvas de peces planos produce albinismo inducido por la dieta, en cambio, el contenido de ARA en la dieta no produjo efectos en la tasa de crecimiento de los peces. Los grupos ARA-L y ARA-H mostraron las mismas tasas de crecimiento tanto para la longitud como para el peso, en cambio en los grupos Echium y Croda, que ingirieron una mayor cantidad de SDA y EPA, sí que se observó un efecto de la dieta sobre el crecimiento.

La composición en ácidos grasos de los peces mimetizó la composición del alimento ingerido. Aunque en humanos se ha demostrado que el SDA es cuatro veces más efectivo que el LNA a la hora de aumentar los niveles de EPA en los fosfolípidos del plasma (James et al., 2003), y que en los cultivos celulares de salmónidos se ha observado elongación del SDA a 20:4n-3 (Ghioni et al., 2002), en el caso del lenguado senegalés no se detectaron diferencias en los niveles de EPA al comparar a los peces del grupo Echium con el resto de los grupos. Por otro lado, considerando los bajos niveles de DPA suministrados en

las dietas, el contenido de este ácido graso en las larvas aumentó significativamente, como ya se observó en el capítulo 5.

Se observó un efecto específico del aceite de Echium sobre la producción de PG (Tabla 8.6). Aunque los peces que ingirieron nauplios de *Artemia* enriquecidos con aceite de Echium recibieron los mismos niveles de ARA que los grupos ARA-H y Croda, la producción de PGE<sub>2</sub> y PGF<sub>2</sub> fue significativamente menor y comparable a la de los peces del grupo ARA-L. Efectos similares del SDA sobre la producción de prostaglandinas han sido descritos por Horia y Watkins (2005) en mamíferos y por Bell et al. (2006) en *G. morhua*. Horia y Watkins (2005) relacionaron la baja producción de prostaglandinas con la inhibición ejercida por el SDA sobre la expresión de la cicloxigenasa-2 (COX-2), enzima que cataliza la producción de prostaglandinas, y sobre la transcripción de NFκB y PPARγ. Bell et al. (2006) consideraron la reducción en la producción de prostaglandinas más una consecuencia de la disminución de ARA en los tejidos, que de un aumento en los niveles de 20:3n-6 o 20:4n-3. Otros estudios in vitro sugieren que, el SDA puede actuar reduciendo la formación de eicosanoides derivados del ARA (Guichardant et al., 1993). En este capítulo, a excepción del grupo ARA-L, todos los peces recibieron la misma cantidad de ARA que fue por lo tanto, acumulada en los tejidos. Considerando los resultados en cuanto a acumulación de ARA en los tejidos, quizá las larvas del lenguado senegalés del grupo Echium tuvieron una menor producción de prostaglandinas como consecuencia de la inhibición de la COX-2. En cambio, el suplemento en EPA de la dieta del grupo Croda, que en mamíferos se asocia a niveles bajos de PG (Petrik et al., 2000), produjo niveles de PG similares a los

del grupo ARA-H, probablemente debido a los altos niveles de ARA (casi el doble del contenido en EPA) observados en el grupo Croda.

Se puede establecer un paralelismo entre niveles de producción de PG y alta frecuencia de producción de individuos pigmentados normalmente. Sin embargo, en un estudio realizado por Bransden et al. (2005c) con larvas de *G. morhua* en tanques de distintos colores en el que se analizó la pigmentación de la zona cefálica así como la del resto del cuerpo, no se pudo encontrar ninguna relación entre la producción de PG y el grado de pigmentación, aunque la mayoría de los peces (del 50 al 80 % para la zona cefálica y del 35 al 50 % para el resto del cuerpo) presentaron una pigmentación normal. Aunque estos autores no encontraron ninguna relación entre el contenido de ARA en la dieta y la producción de PG, los resultados obtenidos en este capítulo muestran una relación muy clara, con excepción del grupo alimentado con aceite de Echium como se ha comentado anteriormente.

Para concluir, la composición en ARA y ARA/EPA de la dieta y en consecuencia la composición de los tejidos, tiene una clara influencia en el índice de pigmentación del lenguado senegalés, como ya se ha descrito en los capítulos 5, 6 y 7. Además, un aumento en la cantidad de ARA en la dieta provoca un aumento claro en la concentración corporal de PG, dando lugar a una correlación directa entre PG y pigmentación. Al incluir el aceite de Echium, el SDA y el GLA en la alimentación, se produjo una reducción en la producción de PG, que resultó en un mejor índice de pigmentación, a pesar de que los niveles de ARA en la dieta y en los tejidos de los peces del grupo Echium fueron similares a los del resto de grupos. El SDA tuvo un claro efecto en la reducción

de la producción de PG, probablemente debido a la inhibición de la producción de COX-2, como ya se ha observado en mamíferos.



*9. CAPÍTULO VI: Estudio morfológico e  
histológico del desarrollo larvario del  
lenguado senegalés*



## **9.1. Introducción**

El lenguado senegalés es un pleuronectiforme, por lo que tanto los individuos juveniles como adultos presentan los dos ojos en un mismo lado del cuerpo, en este caso en concreto en el lado derecho (dextrógiro). Para alcanzar la asimetría es necesario que el ojo izquierdo migre hacia el lado derecho durante la metamorfosis. Los aspectos morfo-anatómicos de la metamorfosis y la migración del ojo durante el desarrollo de las larvas del lenguado senegalés han sido descritos (Lê, 1982; Fernández-Díaz et al., 2001; Gavaia y Cancela, 2002). Sin embargo otros cambios que se observan a lo largo del crecimiento de la larva de esta especie no han sido tan estudiados. La descripción de los cambios anatomo-morfológicos durante el desarrollo es particularmente útil para la caracterización de las larvas durante el desarrollo y permite la estandarización de datos provenientes de experimentos en que se utilizan diferentes temperaturas (Martell et al., 2006) y/o métodos de cultivo. En otras especies se han llevado a cabo estudios similares (Nishikawa y Ueyanagi, 1991; Doi et al., 1994; Koumoundourous et al., 2005), principalmente en *S. maximus*, *P. olivaceus*, *L. yokohamae*, *H. hippoglossus*, *P. dentatus* (Al-Mag hazachi y Gibson, 1984; Fukuhara, 1986, 1988; Pittman et al., 1990; Keefe y Able, 1993; Segner et al., 1995; Martínez y Bolker, 2001).

La histología es una herramienta que permite obtener una evaluación precisa de los cambios que ocurren en los diferentes órganos y tejidos de la larva a lo largo del desarrollo. Se ha publicado ya un importante número de estudios sobre los aspectos histológicos del desarrollo de peces planos, tanto salvajes como cultivados (Boulhic y Gabaudan 1992; Segner et al., 1994, 1995) y

concretamente del lenguado senegalés (Ribeiro et al., 1999; Fehri-Bedoui et al., 2000) muy útiles como método para entender mejor el funcionamiento de los diferentes órganos y particularmente del tracto digestivo. En concreto, Ribeiro et al. (1999) describieron los aspectos histológicos e histoquímicos del desarrollo del sistema digestivo del lenguado senegalés, y por tanto, en el presente capítulo se referirá a este estudio para los detalles y aquí solo se resumirán los aspectos más relevantes.

Así, el objetivo del presente capítulo es ofrecer una descripción de los cambios histológicos y morfológicos más importantes que tienen lugar en las etapas larvaria y post-larvaria del desarrollo del lenguado senegalés. De este modo, la información obtenida sobre la ontogenia de la especie permitirá la mejora en los métodos de cultivo utilizados hasta ahora.

## **9.2. Material y métodos**

Los huevos del lenguado senegalés se obtuvieron de reproductores mantenidos en condiciones naturales de foto y termoperiodo en las instalaciones del IFAPA “El Toruño” (Pto. de Sta. María, Cádiz). Una vez transportados al CA-IRTA, las larvas fueron distribuidas, 50 larvas l<sup>-1</sup>, en tres tanques de malla (150 µm de poro) de 35 l, que se dispusieron en un tanque mayor de 1500 l, este tanque se mantuvo conectado a una unidad de recirculación (Carbó et al., 2003). La temperatura del agua se mantuvo a 19±1 °C, la salinidad a 34 g l<sup>-1</sup>, el fotoperiodo en 18:6 h (L:O). Las larvas se alimentaron de rotíferos desde el día 3 hasta el día 9 después de la eclosión, a una concentración de 10 rotíferos ml<sup>-1</sup> y

de metanauplios de *Artemia* desde el día 6 hasta el día 40 después de la eclosión a una concentración que se fue ajustando según el peso de las larvas, 70% del peso corporal de las larvas entre los días 5 y 15, 20% entre los días 16 y 25, 15% entre los días 26 y 30 y 7,5% entre los días 31 y 40. Las presas vivas se enriquecieron con un producto comercial (DHA Protein Selco, INVE) y se distribuyeron dos veces al día.

Se muestrearon 20 larvas por día en los días 1, 4, 6, 10, 12, 15, 20, 30, 35 y 40 después de la eclosión. Las larvas se sacrificaron individualmente con una sobredosis de MS-222 (1000ppm). Se midió la longitud total con un microscopio de disección (Nikon SMZ800) y con la ayuda de un analizador de imágenes (Analysis SIS, GmBh, Alemania). El estadio de desarrollo se determinó teniendo en cuenta los principales aspectos morfológicos externos (Tabla 9.1). Para el análisis histológico las larvas fueron inmediatamente fijadas con formalina tamponada al 10%. A partir del día 25, después de ser fijadas en formalina, las larvas pasaron por un periodo de descalcificación de 24-48 h, durante el cual se mantuvieron sumergidas en ácido fórmico al 8%. En cada día de muestreo, 10 de las larvas muestreadas fueron incluidas individualmente en parafina y las otras 10 se procesaron, también individualmente, para ser incluidas en metacrilato. Se hicieron cortes seriados de 6 y 2  $\mu\text{m}$ , para los bloques de parafina y metacrilato, respectivamente, y las secciones fueron teñidas con hematoxilina – eosina (parafina) o con azul de toluidina (metacrilato). Las larvas se fotografiaron con una cámara digital DP70 conectada a un microscopio (Leica DMLB).

Para caracterizar el desarrollo larvario de acuerdo con las principales características externas, se utilizaron 5 estadios de desarrollo principales y 6 subestadios (Tabla 9.1). Para determinar el estadio de la metamorfosis y de la

migración del ojo se utilizaron los mismos estadios descritos por Fernández-Díaz et al. (2001), pero considerando aquí sus estadios 1, 2, 3 y 4 como 4a, 4b, 4c y 5.

### **9.2.1. Estudio cuantitativo del desarrollo de la glándula tiroidea**

De cada una de las larvas analizadas se fotografió cada uno de los cortes seriados en los que aparecían folículos tiroideos. Desde estas fotografías y mediante un analizador de imágenes (Analysis SIS, GmbH, Alemania) se calculó el número exacto de folículos tiroideos por larva y calculando el área de cada folículo en cada fotografía se pudo obtener el área folicular total para cada una de las larvas.

## **9.3. Resultados**

En este apartado se describe el desarrollo para cada uno de los distintos órganos y sistemas de la larva. El resumen de los principales cambios morfológicos para cada uno de los estadios se muestra en la Tabla 9.1. En la Tabla 9.1. también se muestran las características de cada uno de los estadios en términos de requerimiento de temperatura (grados-día, °D), así como la talla media, dispersión de talla y edad observada en cada uno de los estadios.

### **9.3.1. Tegumento**

Al eclosionar, la piel está constituida por un epitelio simple con dos capas de células epiteliales escamosas y con células cloruro y císticas repartidas de forma más o menos homogénea por toda la epidermis. Entre la epidermis y los

órganos internos, se observa un gran espacio subdérmico que aparentemente parece que pueda estar lleno de fluido. Entre el epitelio y los órganos no se observa presencia de dermis, sólo de células pigmentarias embrionarias.

En el estadio 2, la estructura de la piel se mantiene similar al estadio anterior, pero en este caso el espacio subdérmico es menor y las células cloruro tienden a concentrarse alrededor de la zona cefálica.

En el estadio 3, se desarrollan un importante número de melanóforos, claramente distintos a los descritos en el estadio 1, localizados en la base del espacio subdérmico, justo en la parte externa de las capas musculares epaxiales y hipoxiales. Estos melanóforos se caracterizan por un desarrollo considerable de las proyecciones citoplasmáticas. En este estadio, algunas áreas del espacio subdérmico desaparecen completamente.

En el estadio 4 se observa claramente el desarrollo de una lámina basal incipiente en la base de la epidermis, así como la disminución considerable del número de células císticas. La mayoría de espacios subdérmicos desaparecen y en su lugar aparecen algunos fibroblastos formando un tejido conectivo laxo que ocupa el espacio entre la epidermis y las estructuras subyacentes.

En el estadio 5, la estructura del tegumento es similar a la observada en el estadio 4. La única diferencia notable ocurre en el subestadio 4c y en el estadio 5, con la aparición de células mucosas en la base de la epidermis. Es de destacar también que en este estadio los barbillones aparecen en la zona bucal, se desarrollan en la epidermis y están formados por proyecciones dérmicas que se extienden al exterior y que están rodeadas por grupos de células epiteliales. En estos barbillones no se detectan papilas gustativas. Durante el estadio 5 no se detectó la formación de escamas.

Estadio	Descripción	X Talla (mm)	X Días (dph)	X °Día	Dispersión
1a	La larva es simétrica con la notocorda recta. El saco vitelino está presente y contiene algunos glóbulos lipídicos dispersos. El tubo digestivo está ligeramente curvado y rodea la zona superior del saco vitelino. La cabeza está curvada hacia abajo y se mantiene unida al saco vitelino. Los melanóforos se distribuyen a lo largo del eje longitudinal del cuerpo y en la aleta que lo envuelve. La larva es poco móvil, flota hacia uno de sus lados o mantiene el saco vitelino hacia arriba (Figura 9.41 (1a)).	2,22±0,44	0h	0	0h-100%
1b	El tubo digestivo se engrosa en la zona media y se curva en la zona distal. El ano se mantiene próximo al límite de la aleta ventral pero no completamente abierto. Los melanóforos forman cuatro grupos en la zona dorsal y uno en la ventral, en el resto del cuerpo se mantienen dispersos. El saco vitelino reduce el tamaño. Los ojos empiezan a pigmentarse. Aparece una distensión en la parte dorsal de la cabeza (Figura 9.41 (1b)).	2,68±0,19	1	20	1dph-100%
1c	El saco vitelino se encuentra muy reabsorbido, en la mayoría de los casos no se observan glóbulos lipídicos. El tubo digestivo forma un bucle en la zona media. La boca y el ano se abren al exterior. Los ojos totalmente pigmentados. La larva muestra un comportamiento depredador (Figura 9.41 (1c)).	3,14±0,13	3	59,1	3dph-100%
2	El saco vitelino está totalmente reabsorbido. La distensión dorso-craneal desaparece. Hay presas claramente visibles en el interior del digestivo (Figura 9.41 (2)).	3,37±0,25	4,54±0,89	90,23±18,32	4dph-73,2% 6dph-26,8%
3	Aparece la vejiga natatoria en la parte superior del digestivo. La notocorda se curva ligeramente hacia arriba. Aparecen los radios hipurales en el esbozo de la aleta caudal. La aleta dorsal cubre la zona de la cabeza. El tamaño de los miotomos aumenta. Los melanóforos ocupan la mayor parte del cuerpo, aumentan en número (Figura 9.41 (3)).	3,93±0,27	7,72±2,35	154,19±46,19	6dph-62,3% 10dph-29,5% 12dph-6,5% 15dph-1,7%



Estadio	Descripción	X Talla (mm)	X Días (dph)	X °Día	Dispersión
4a	Empieza la migración del ojo y la asimetría del cuerpo. La notocorda curvada hacia arriba menos de 45°. El número de radios en la aleta caudal aumenta y se observa su forma final. Aparecen los radios en todas las aletas. Todo el cuerpo está pigmentado menos la zona de los radios. El inicio de la altea dorsal se localiza detrás de los ojos. Aparecen las cavidades olfativas (Figura 9.41 (4a)).	4,89±0,37	11,43±1,68	227,27±32,73	10dph-40,4% 12dph-53,8% 15dph-3,8% 20dph-2%
4b	El ojo izquierdo empieza a ser visible desde el lado derecho. La vejiga natatoria desaparece. La curvatura de la notocorda se mantiene entre 45° y 90°. Los radios de las aletas están totalmente desarrollados (Figura 9.41 (4b)).	6,14±0,51	15,18±0,93	298,27±17,82	15dph-96,5% 20dph-3,5%
4c	El ojo izquierdo se posiciona en el lado derecho. La notocorda alcanza la curvatura de 90°. La pigmentación es total, incluyendo todas las aletas. Aparecen los melanóforos pequeños (tipo adulto) junto con los melanóforos grandes (tipo larvario). El inicio de la aleta dorsal avanza (Figura 9.41 (4c)).	6,60±0,77	20,36±1,89	397,68±35,89	15dph-22,1% 20dph-63,3% 30dph-14,6%
5	La migración del ojo ha finalizado y el ojo izquierdo se posiciona junto al derecho. El hueso parafrontal se extiende y el hueco dejado por la migración del ojo se rellena. La aleta dorsal se extiende por delante de la zona ocular. Aparecen los barbillones alrededor de la boca. La pigmentación es similar a la de los juveniles, mostrando toda la gama de cromatóforos. La metamorfosis ha concluido (Figura 9.41 (5)).	11,01±2,04	30,88±6,24	597,55±118,59	20dph-19,6% 30dph-39,9% 37dph-40,5%

Tabla 9.1. Características del desarrollo larvario del lenguado senegalés de acuerdo con criterios morfológicos externos y su correspondencia con las medias de las tallas observadas (mm, media±SD), la edad (dph, media±SD), los grados día después de la eclosión (°Día, media±SD) y la dispersión en cuanto a la edad de la larva (dph, %) en cada uno de los estadios.

### **9.3.2. Sistema respiratorio**

En el estadio 1, el primer y cuarto arco branquial son simplemente esbozos formados por una masa de células indiferenciadas rodeadas de células epiteliales, mientras que en la zona central del segundo y tercer arco ya se observa el inicio del proceso de condrogénesis, pudiendo distinguirse un eje central cartilaginoso rodeado por una matriz extracelular. En este estadio no se observa la presencia aún de filamentos branquiales.

El estadio 2 se caracteriza por el inicio de la condrogénesis y el desarrollo de los filamentos primarios en los arcos branquiales primero y cuarto de forma similar a lo descrito para los arcos segundo y tercero en el estadio 1. En este estadio se observa por primera vez el desarrollo de filamentos primarios, apareciendo como grupos de células indiferenciadas que crecen perpendicularmente a los arcos branquiales. En el segundo y tercer arcos branquiales, el desarrollo de los filamentos, tanto en número como en longitud, es mucho más avanzado que los del primero y cuarto arcos branquiales. En este estadio también se desarrollan en la base de cada uno de los filamentos algunas fibras musculares así como nuevas estructuras vasculares. La cavidad branquial está totalmente cubierta por una capa de epitelio compuesta por 2-3 capas de células epiteliales, entre las que se observan algunas células cloruro (Figura 9.1).

En el estadio 3 aparece matriz extracelular en el cartílago de los arcos branquiales. En la base de algunos filamentos primarios del segundo y tercer arcos aparecen pequeñas digitaciones formadas por células poco diferenciadas que darán lugar a los filamentos secundarios (laminillas branquiales). En la parte interna de los filamentos se observa el desarrollo de capilares sanguíneos y en su interior ya es posible observar la presencia de eritrocitos (Figura 9.2). También

se observa la presencia de células cloruro que se distribuyen entre las laminillas emergentes. En este estadio ya puede observarse la presencia de filamentos en toda la longitud de los arcos branquiales.

En el subestadio 4a, el tamaño de los arcos branquiales y de los filamentos sigue aumentado y las laminillas están presentes en todos los filamentos. Algunas laminillas, especialmente aquellas que se encuentran en la base de los filamentos primarios, ya muestran la estructura típica con células pilar y espacios vasculares, en los que se puede observar la presencia de eritrocitos y otras células sanguíneas. En este estadio se evidencia un mayor número de células cloruro localizadas en los filamentos y entre las laminillas. En la zona opuesta a los filamentos, se observa en los arcos branquiales el desarrollo de unas pequeñas proliferaciones epiteliales que corresponden al desarrollo de las branquiespinas. En el subestadio 4b, los arcos branquiales muestran una estructura similar a la de los juveniles, con un eje central cartilaginoso así como grupos de fibras musculares. En la zona interna de los filamentos primarios se observa también la diferenciación de algunos condroblastos, mientras que las células cloruro están presentes en todos los espacios interlamelares, desde la base hasta la zona apical de los filamentos. En este subestadio se puede observar la diferenciación de algunas células mucosas dispersas entre la capa epitelial de los filamentos. En el subestadio 4c, la gran mayoría de estructuras branquiales presentan la misma morfología que en los juveniles de esta especie (Figura 9.3), salvo la osificación de algunas de las estructuras cartilaginosas, como los ejes de los filamentos branquiales (Figura 9.4) que no son observadas hasta el estadio 5.

### **9.3.3. Pseudobranquia**

La pseudobranquia aparece por primera vez en el subestadio 4b. En esta fase del desarrollo está formada por un acúmulo de células epiteliales que la recubren, algunas células de cloruro y en su interior algunas estructuras vasculares poco desarrolladas. En el subestadio 4c se aprecia como los filamentos ya se han formado y como las laminillas inician su desarrollo. En el interior de los filamentos se observan las estructuras vasculares. Las células cloruro se sitúan alrededor de las laminillas. En el estadio 5 se observa como la pseudobranquia está formada por cuatro filamentos y la presencia de un quinto filamento menos desarrollado (Figura 9.5).

### **9.3.4. Tracto digestivo, reservas endógenas, hígado y páncreas**

Como se ha indicado previamente, la descripción del sistema digestivo durante el desarrollo de la larva del lenguado senegalés ha sido publicado por Sarasquete et al. (1996), Ribeiro et al. (1999) y Fehri-Bedoui et al. (2000). Los principales cambios observados en el presente estudio durante el desarrollo del sistema digestivo han sido similares a los descritos por estos autores, y por lo tanto en este estudio se utilizan los datos de estos trabajos, que han sido resumidos en forma de tabla (Tabla 9.2). Sin embargo, en estos estudios no se describe el saco vitelino ni su evolución. Por lo tanto, en este capítulo sí que se describirá esta estructura y su evolución durante la reabsorción vitelina.

En el momento de la eclosión (Subestadio 1a), la larva del lenguado senegalés muestra la estructura típica de eleuteroembrión. La larva posee un tracto digestivo formado por un tubo recto no abierto al exterior ni por la zona orofaríngea ni por la zonal anal y presenta un gran saco vitelino. Este saco

vitelino está formado por una masa central homogénea de vitelo y algunos glóbulos lipídicos dispersos a lo largo de la periferia del saco y se encuentra rodeado por una membrana sincitial. Ocasionalmente también pueden observarse grupos esféricos de células sincitiales en el interior del saco vitelino, distanciadas del resto. En los subestadios 1b y 1c se observan largas proyecciones de la membrana sincitial hacia el interior del vitelo. En el estadio 2, la mayor parte del vitelo se ha reabsorbido y solo se observan, en las proximidades del hígado, algunos restos de vitelo y glóbulos lipídicos rodeados de células sincitiales dispersas.

### **9.3.5. Órganos endocrinos**

#### **9.3.5.1. Islotes de Langerhans**

En los estadios 1 y 2 se observa un único islote de Langerhans poco diferenciado y localizado entre un grupo de acinis pancreáticos situados detrás de la vesícula biliar (Figura 9.6). En el estadio 3 el islote parece aumentar notablemente su tamaño, produciéndose una diferenciación morfológica de los componentes titulares (células alfa y beta) y mostrando un aspecto muy similar al que se observa en individuos juveniles (Figura 9.7). A partir del subestadio 4c se desarrollan otros islotes más pequeños repartidos entre las otras localizaciones del páncreas exocrino (Figura 9.8).

dph	Fehri-Bedoui et al. (2000)	Ribeiro et al. (1999)	Sarasquete et al. (1996)
0	Tracto digestivo recto, uniforme en diámetro, indiferenciado y cerrado. Hígado y páncreas presentes pero sólo como células indiferenciadas.	Tracto digestivo recto, indiferenciado y formado por epitelio monoestratificado.	Tracto digestivo indiferenciado. Estómago delimitado por epitelio cúbico.
1		En el tracto digestivo se diferencian dos porciones: la anterior (epitelio escamoso) y la posterior (epitelio columnar). Hígado localizado en el lado izquierdo de la larva. Páncreas localizado en la parte posterior del hígado y ocupa los dos lados de la cavidad abdominal.	
2	Esófago delimitado por epitelio cúbico. Estómago no completamente diferenciado. Tracto digestivo recto sin células mucosas	Esófago delimitado por epitelio cúbico. Estómago delimitado también por epitelio cúbico y con una ligera constricción en la parte posterior (inicio del intestino). Se observa una torsión en la tercera porción del digestivo. Aparece una válvula que divide la parte anterior y posterior del intestino, ambas delimitadas por epitelio columnar. El páncreas muestra un aumento en el número de acinis. Sólo se observa un único islote de Langerhans en el interior del páncreas exocrino.	Esófago diferenciado. Apertura de la boca.
3	Esófago diferenciado con presencia de células mucosas. Estómago diferenciado. Hígado y páncreas diferenciados.	Se observan células mucosas en el esófago. Hígado granular. Hepatocitos con morfología más definida. Se observan gránulos de cimógeno en el interior del páncreas.	
4	Tracto digestivo diferenciado en dos partes.		Se observa glucógeno en el hígado y vacuolas lipídicas en los enterocitos.

dph	Fehri-Bedoui et al. (2000)	Ribeiro et al. (1999)	Sarasquete et al. (1996)
5	Células mucosas presentes en el intestino.	Células mucosas presentes en la cavidad bucal. Conductos pancreáticos y biliares abiertos al intestino anterior.	
6		La cavidad bucal aumenta en tamaño.	
7		Aumentan las vesículas en el citoplasma de las células del hígado.	
8		Se observan proyecciones desde la epidermis a la cavidad bucal.	
9	Músculos digestivos fuertemente desarrollados. Migración del ano hacia delante.		
12	Hígado y páncreas bien diferenciados. Estómago delimitado por epitelio prismático.	Migración del ano hacia delante. Reorganización de la cavidad bucal y branquial.	
13		Estómago aumenta en tamaño.	
15			No se observan glándulas digestivas en el estómago.
18	Aparición de las glándulas digestivas. Hígado similar al adulto.		
27		Se desarrollan las glándulas gástricas tubulares.	

Tabla 9.2. Desarrollo del sistema digestivo basado en la bibliografía existente.

#### **9.3.5.2. Glándula tiroides**

No se observa desarrollo de folículos tiroideos hasta que la larva alcanza el estadio 3. En este estadio, pueden observarse de dos a cuatro folículos pequeños localizados alrededor de la aorta ventral. Estos folículos están formados por un epitelio cúbico simple que rodea un lumen que contiene un material coloidal de aspecto hialino (Figura 9.9). A partir de este estadio aumenta el número de folículos y la cantidad de coloide en el interior de los mismos. En las larvas en estadio 5 se pueden contabilizar más de treinta folículos tiroideos (Figura 9.10). En la Figura 9.42 se representa el aumento progresivo del número de folículos y del área total que ocupan.

#### **9.3.5.3. Corpúsculos de Stannius**

Los corpúsculos de Stannius no son evidenciables hasta que la larva alcanza el subestadio 4c, momento en el que se observa un pequeño grupo de células indiferenciadas en el área dorso-posterior del riñón. En el estadio 5 se hace más evidente la forma y organización de los corpúsculos, que ya es similar a los observados en individuos juveniles.

#### **9.3.5.4. Tejido interrenal y células cromafines**

El tejido interrenal – células cromafines se detecta por primera vez en el subestadio 4a. Están formados por grupos de células cuboidales, localizados en el área pronéfrica del riñón, generalmente teñidos muy débilmente.



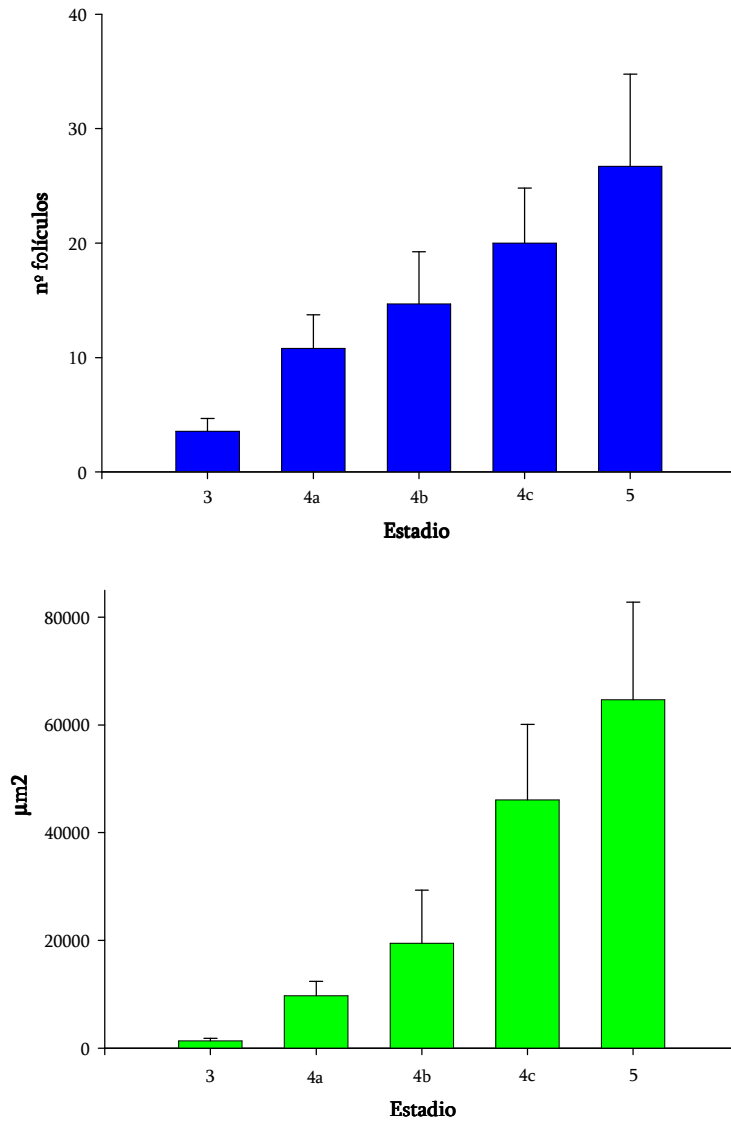


Figura 9.42. Representación del número total de folículos por larva y del área total ocupada por los folículos en cada uno de los estadios en los que se observa el desarrollo de la tiroides (media±SD,  $n=240$ ).

El número de estas células va aumentando a lo largo del desarrollo, pero no se observa ninguna distribución específica alrededor de las venas cardinales.

### **9.3.6. Riñón excretor**

En el estadio 1 el riñón excretor está formado por un par de túbulos pronéfricos primarios rectos y poco diferenciados. Se desarrollan en la zona caudal, a partir de la mitad del cuerpo de la larva y se localizan junto al eje de la notocorda.

En el estadio 2 los túbulos pronéfricos primarios están completamente diferenciados y formados por un epitelio cúbico simple que delimita un espacio interior, o luz tubular, de dimensiones reducidas. Estos dos túbulos se unen en la región caudal para formar la vejiga urinaria, que se abre al exterior junto con la porción final del ano. La vejiga urinaria está formada por epitelio cúbico, más plano en su parte más caudal, que delimita un lumen mucho más amplio que el de los túbulos pronéfricos. En la región craneal, cada uno de los dos túbulos se curva para formar una cápsula de Bowman rudimentaria que engloba un corpúsculo renal no desarrollado. Se observa un espacio de Bowman de reducido tamaño (Figura 9.11).

En el estadio 3 se observa un amplio espacio de Bowman rodeado de un epitelio plano formando la cápsula de Bowman. La torsión de los túbulos pronéfricos en la zona craneal aumenta, haciendo que su luz tubular sea mucho más amplia que en el estadio 2. La parte posterior, que ahora está diferenciada en conductos pronéfricos, continúa siendo recta en su zona central pero se observa el inicio de la torsión en la zona caudal.

En el subestadio 4a aumenta la torsión de los túbulos pronéfricos tanto en la zona craneal como en la región caudal (Figura 9.12 y 9.13). En el subestadio 4b se empiezan a desarrollar unos túbulos mesonéfricos rudimentarios apareciendo como pequeñas proyecciones de la región dorsal de los conductos pronéfricos. En este estadio se observa la presencia de acumulaciones minerales en la vejiga de algunos de los peces muestreados. En el subestadio 4c se hacen evidentes los túbulos mesonéfricos y algunos corpúsculos renales rudimentarios (Figura 9.14).

En el estadio 5 se observa la completa formación de las nefronas mesonéfricas, aunque los corpúsculos renales mesonéfricos continúan siendo de menor tamaño que los corpúsculos pronéfricos (Figura 9.15).

### **9.3.7. Órganos linfoides**

#### **9.3.7.1. Tejido hematopoyético renal**

Durante el estadio 1 se pueden observar algunas células indiferenciadas alrededor de la masa mesodérmica y de los túbulos pronéfricos primarios.

En el estadio 2 se observan capilares sanguíneos muy finos (sinusoides) y células hematopoyéticas muy poco diferenciadas (Figura 9.11) entre los conductos urinarios primordiales.

En el estadio 3 el número de células hematopoyéticas aumenta y se pueden observar grupos de estas células entre los sinusoides. El grado de diferenciación celular se mantiene bajo, aunque es posible observar algún eritrocito maduro en el lumen de los sinusoides.

En el subestadio 4a se observa un aumento del número de eritrocitos dentro de los vasos sanguíneos renales así como en el desarrollo del tejido hematopoyético entre las convoluciones de los túbulos pronéfricos de la región craneal (Figura 9.12). En el subestadio 4b es posible distinguir linfocitos aparentemente maduros y granulocitos en los agregados hematopoyéticos, el número de estos agregados aumenta notablemente en la región craneal y alrededor de toda la longitud de los conductos pronéfricos. Asimismo, en el subestadio 4c, los agregados de células hematopoyéticas más desarrollados se localizan en la región craneal.

En el estadio 5 la extensión de riñón ocupada por el tejido hematopoyético aumenta, aunque no se detectan cambios adicionales en el desarrollo de las estructuras y células que componen este tejido.

#### **9.3.7.2. Bazo**

El bazo se observa por primera vez en el estadio 2, localizado entre el páncreas y la porción anterior del intestino medio. Su morfología en este estadio es esférica y está delimitado externamente por una membrana mesotelial fina. La zona interna está constituida por agregados de células hematopoyéticas poco diferenciadas, entre las que se pueden observar algunos capilares sanguíneos (Figura 9.16).

En el estadio 3 las células hematopoyéticas, los capilares sanguíneos y los eritrocitos observables dentro de los vasos sanguíneos aumentan en número. El bazo pierde la forma esférica y va adquiriendo una morfología marcadamente más ovoide (Figura 9.17).

En el subestadio 4a la presencia de capilares sanguíneos (sinusoides esplénicos) se hace más evidente y empiezan a desarrollarse los elipsoides esplénicos. En el subestadio 4b, la morfología del bazo es claramente elíptica, similar a la que presentan los individuos adultos. Se aprecia el inicio de la formación de tejido linfoide, que aparece en forma de áreas difusas entre el tejido hematopoyético (Figura 9.18). En el subestadio 4c, tanto los elipsoides como los sinusoides esplénicos aumentan en talla y número. No se observan cambios mayores en el desarrollo. Algunos elipsoides presentan la misma estructura que la que se observa en individuos post-metamórficos.

En el estadio 5 la estructura principal del bazo se mantiene como en el estadio anterior. El tejido hematopoyético se sitúa en las zonas externas, mientras que los elipsoides esplénicos y el tejido linfoide se sitúan en zonas más internas.

### **9.3.7.3. Timo**

El timo se observa en el subestadio 4a como una masa elíptica de células esféricas poco diferenciadas. Se localiza en el epitelio de la región dorso-posterior de la cavidad orofaríngea, justo al lado de las cápsulas óticas y frente a la región craneal del riñón. En los siguientes subestadios el tamaño del timo aumenta, y se pueden observar algunas células diferenciadas como, timocitos y células reticulares (Figura 9.19). En el subestadio 4c y en el estadio 5, los timocitos se localizan principalmente en la parte externa del timo, mientras que las células hematopoyéticas, menos diferenciadas (aparentemente linfoblastos), se observan en la parte interna del órgano. Ocasionalmente se pueden observar algunas células granulares y células mieloides.

### **9.3.8. Corazón y principales vasos sanguíneos**

#### **9.3.8.1. Corazón**

En el estadio 1 el corazón está muy poco desarrollado. Se observa justo debajo del área cefálica, con una morfología tubular que se abre a la zona del saco vitelino. En este estadio está formado solamente por una membrana endocardial interna y una miocardial externa. No se observa segmentación (Figura 9.20).

En el estadio 2 el corazón se localiza en el interior de la cavidad cardíaca, ya que el septo transversal ya se ha formado. Se pueden observar cuatro segmentos bien diferenciados debido a las constricciones presentes entre ellos: seno venoso, atrio, ventrículo y bulbo arterioso. Se observan las venas cardinales primordiales, que van a desembocar en el atrio. El seno venoso está delimitado por una capa endotelial delgada, el endocardio, sin presencia de células miocárdicas en sus paredes. El endocardio también se observa en el atrio, pero en este caso, el atrio presenta una capa de células miocárdicas. En este estadio aún no se ha desarrollado la válvula seno-atrial, pero sí se observa una válvula atrio-ventricular poco desarrollada. La cámara cardíaca más desarrollada es el ventrículo, mientras que el bulbo arterioso está formado por un grupo esférico de células indiferenciadas que engloban ya a una pequeña cavidad. El ventrículo está formado por una membrana endotelial, similar a la descrita para el seno venoso y el atrio, y de dos a tres capas de células miocárdicas (Figura 9.21).

En el estadio 3 el atrio y el ventrículo están claramente separados por la válvula atrio-ventricular, mientras que la válvula seno-atrial empieza a

desarrollarse en este estadio. En el ventrículo aparecen las trabéculas como proyecciones de células miocárdicas, rodeadas completamente por tejido endocárdico. En la zona exterior del bulbo aparece tejido conjuntivo elástico. En este estadio, el número de eritrocitos maduros presentes en su interior va aumentando (Figura 9.22).

En el subestadio 4a se hace evidente la conexión entre la vena hepática y el seno venoso, ahora claramente separado del atrio por la válvula seno-atrial. En este estadio la válvula bulbo-ventricular también se hace evidente. El lumen del bulbo arterioso ahora está delimitado por dos capas de tejido: endocardio y tejido conjuntivo elástico, que en la zona distal se transforman en la pared de la aorta ventral (Figura 9.23). En el subestadio 4b se desarrolla completamente la válvula seno-atrial que separa el seno venoso del atrio. En este estadio las trabéculas empiezan a aparecer también en el atrio, mientras que en el ventrículo estas ya han proliferado extensamente. La válvula atrio-ventricular tiene la misma apariencia que la de los peces post-metamórficos. En el lumen de todos los segmentos del corazón se pueden observar eritrocitos maduros (Figura 9.24 y 9.25). En el subestadio 4c las trabéculas del atrio han proliferado en número, aunque mantienen un menor desarrollo comparado con las que se observan en el ventrículo.

En el estadio 5, la estructura del corazón es la misma que la que se observa en individuos juveniles, el cambio observado es únicamente debido al tamaño de las estructuras, sin observarse nuevos cambios en las proporciones (Figura 9.26).

### **9.3.8.2. Principales vasos sanguíneos**

En el estadio 2, la aorta ventral se observa como un capilar rudimentario que conecta el bulbo arterioso con las branquias incipientes. La estructura se mantiene con una morfología similar durante el estadio 3. En el subestadio 4a, se observan en la zona caudal de dos a tres capas de fibras aparentemente elásticas, similares a las que se observan en el bulbo arterioso. Más tarde, en el estadio 5, estas fibras ya se extienden a lo largo de toda la longitud de la arteria aorta. Las venas cardinales, la vena caudal y otras venas y estructuras arteriales mantienen una estructura capilar, formada únicamente por una capa epitelial a lo largo de todo el desarrollo de la larva.

### **9.3.9. Vejiga natatoria**

La formación de la vejiga natatoria empieza en el subestadio 1c. La vejiga natatoria primordial se diferencia a partir de la pared dorsal del intestino medio y está formada por una única capa de células cúbicas (Figura 9.27).

En el estadio 2 la vejiga natatoria se compone de una cámara de gas, una glándula de gas rudimentaria y un conducto neumático que conecta la cámara de gas con la zona anterior del digestivo (Figura 9.28). La cámara de gas está formada por dos capas de epitelio cúbico simple, mientras que una masa de células indiferenciadas, localizadas en la parte posterior de la cámara formará la rete mirabile. Aunque en este estadio es posible observar un pequeño lumen en el interior de la cámara de gas, no es hasta el estadio 3 cuando la cámara aumenta de tamaño significativamente.

En el estadio 3 se puede observar macroscópicamente una burbuja de gas en el interior de la larva. La glándula de gas aumenta su tamaño, el conducto



neumático aún está presente y se puede observar una pequeña rete mirabile en la región ventro-caudal de la vejiga natatoria. Debido a la presión que contiene la glándula de gas, el tejido conjuntivo que rodea a la vejiga natatoria se ha compactado (Figura 9.29).

La cámara de gas alcanza su mayor tamaño durante el subestadio 4a. A partir de este estadio la cámara de gas disminuye su tamaño a medida que las estructuras de la vejiga natatoria involucionan. En el subestadio 4b la burbuja de gas ya no se percibe macroscópicamente y la vejiga natatoria empieza el proceso de involución (Figura 9.30).

En el estadio 5, la mayoría de las estructuras de la vejiga natatoria aparecen colapsadas y claramente degeneradas (Figura 9.31).

### **9.3.10. Encéfalo y órganos de los sentidos**

#### **9.3.10.1. Encéfalo**

En el momento de la eclosión el sistema nervioso de la larva está compuesto por el encéfalo y la médula espinal. En un primer momento el encéfalo está compuesto por dos lóbulos, el anterior, de forma más redondeada y el posterior, de forma más alargada y que conecta con la médula espinal. Por debajo de esta médula espinal se localiza la notocorda, y ambos se acompañan por toda la longitud del eje axial de la larva. A medida que progresa el estadio 1, se observa la diferenciación del lóbulo anterior, compuesto por los dos lóbulos ópticos (el mesencéfalo) y una masa medial (el diencéfalo), bajo la que se observa la hipófisis. El lóbulo posterior da lugar a la médula oblonga o mielencéfalo. En este estadio es posible observar la diferenciación entre la zona

de materia gris, donde se encuentran los cuerpos de las neuronas, y la de materia blanca, donde se localizan las terminaciones nerviosas. Recubriendo todas estas zonas del encéfalo y de la médula se observa una fina capa de células de morfología alargada y con muy poco grosor que parece corresponder a una capa meníngea.

En el estadio 2 las células meníngeas son mucho más evidentes debido a la aparición de melanocitos que presentan grandes extensiones citoplasmáticas y que se asocian íntimamente a la capa de células meníngeas. Se diferencian, en la parte anterior del hemisferio cerebral, los dos lóbulos olfativos, que forman el telencéfalo. En el diencéfalo se diferencian el epítalamo y el hipotálamo. En el epítalamo se puede observar el desarrollo de los ganglios habenuares y de la glándula pineal, formada por un tallo y una vesícula, mientras que el hipotálamo aparece dividido en el seno infundibular y el seno lateral o saccus vasculosus. El mesencéfalo queda localizado en la zona superior del diencéfalo, con sus dos lóbulos ópticos mucho más desarrollados que en el estadio anterior y en el que se puede observar el desarrollo diferencial de una zona dorsal que se corresponde al tectum opticum y una pequeña protuberancia en la zona posterior, que se corresponde al cerebelo. También se observa la formación de las cápsulas óticas a cada lado del mielencéfalo. En este estadio el tectum opticum, el mielencéfalo y el telencéfalo, están formados por diversas capas estratificadas. En el estrato externo se diferencian tres capas de neuroblastos, el estrato medio está formado por varias capas de neuroblastos compactos y el estrato interno es la capa más ancha en la que los neuroblastos presentes están muy dispersos.

En el estadio 3, la estructura del sistema nervioso está mucho más desarrollada y se observa un aumento en el contenido de materia blanca. En este estadio, los lóbulos olfativos y los ganglios habenulares están más diferenciados. En el cerebelo o metencéfalo se diferencia el corpus cerebelli, compuesto por un cuello en el que se localizan las fibras nerviosas y una cabeza, en las que hay más cantidad de neuroblastos (Figura 9.32 y 9.33).

En el subestadio 4a se forman las fosas olfativas dentro de los lóbulos olfativos. En el tectum óptico se aprecia la formación de nuevos estratos debido a un aumento de la cantidad de materia blanca. La capa exterior es delgada y en ella se observan pocos neuroblastos dispersos, la capa media es de mayor tamaño, se puede denominar estrato fibroso y está ocupada por la materia blanca, la capa más interna es el estrato periventricular y en él se encuentran los neuroblastos. Debajo del tectum opticum se forma, delimitado por una capa de células endodiales, el tercer ventrículo. En el corpus cerebelli se pueden diferenciar dos estratos, uno externo o corteza, formado por neuroblastos con poca separación entre sí y uno interno o médula, donde los neuroblastos se encuentran más dispersos. También en este estadio se observa la formación de la válvula cerebelli, localizada en la base del cuello del corpus cerebelli (Figura 9.34).

En el subestadio 4b se empieza a observar el desarrollo de las estructuras vasculares (capilares) en los que se observa la existencia de eritrocitos maduros en su interior. Las primeras neuronas aparentemente maduras aparecen en la zona límite entre la materia blanca y gris (Figura 9.35). En este estadio, las fosas olfativas están totalmente formadas ya que la evaginación de los bulbos olfativos ha permitido el contacto de la cavidad interna con el exterior. La capa de células

ependimales se hace más evidente en este estadio debido a que sus extensiones citoplasmáticas rellenan el tercer ventrículo. La corteza del corpus cerebelli recubre todo el cerebelo.

En el subestadio 4c prosigue la vascularización del cerebro. Las fosas olfativas aparecen conectadas entre ellas por su zona más interna. Aparece el lóbulo medio en la zona superior del saccus vasculosus. La corteza del corpus cerebelli aumenta su grosor debido al aumento en el número de fibras nerviosas, entre ellas es posible distinguir algunas células de Purkinje.

En el estadio 5 las estructuras del sistema nervioso en general muestran un desarrollo importante. Las neuronas maduras aparecen ya dispersas por todo el sistema nervioso central y el número de fibras nerviosas aumenta notablemente en la corteza del corpus cerebelli, formando la capa molecular. Ahora la médula está formada por neuroblastos con poca separación entre ellos, en lo que se denomina capa granular principal. Las células de Purkinje se localizan en el límite entre la capa molecular y la granular.

### **9.3.10.2. Neuromastos**

Los neuromastos libres se observan por primera vez ya en el momento de la eclosión de la larva, localizados en la capa epidérmica, especialmente en la región cefálica (Figura 9.37). Durante los estadios posteriores y hasta el estadio 5, los neuromastos libres siguen estando presentes en la epidermis de la larva. No se ha podido realizar una determinación cuantitativa del número de neuromastos libres desde las secciones histológicas, pero parece que su número se mantiene constante durante el desarrollo larvario. Aunque los neuromastos se han observado en todo el cuerpo de la larva, no ha sido posible realizar un

estudio del desarrollo de la línea lateral debido a la metodología usada (cortes longitudinales).

### **9.3.10.3. Epitelio olfativo**

En el momento de la eclosión se observan dos placas olfativas entre los ojos y el área bucal. Están compuestas por células sensoriales prismáticas que muestran un elevado número de cilios. Estas placas olfativas son externas desde la eclosión hasta el estadio 3, cuando empiezan a invaginarse en la placa etmoides para formar la cápsula nasal (Figura 9.36). En el subestadio 4b las células sensoriales olfativas se agrupan en una cavidad interna rodeada de fibras elásticas. Desde este estadio hasta el estadio 5, no se observan más cambios.

### **9.3.10.4. Vesículas óticas**

En el estadio 1 se observan los esbozos de los canales semicirculares de las vesículas óticas. En el estadio 2 se diferencian las máculas sensoriales y unos otolitos rudimentarios. De este estadio en adelante el tamaño de las cápsulas óticas aumenta, así como el tamaño de las máculas sensoriales y los otolitos, pero la estructura general se mantiene igual.

### **9.3.10.5. Ojos**

En el estadio 1 la estructura de los ojos está poco desarrollada. El globo ocular y los esbozos de las lentes están claramente formados, pero las células que los componen aún están poco organizadas. Se observa el esbozo de la cámara ocular y de la cornea. La estructura de la retina en capas se puede distinguir desde el subestadio 1b (Figura 9.38) y aparece mucho más diferenciado que el

resto de estructuras oculares. Empezando desde el exterior hacia el interior, las capas que se observan son:

- Capa de células poco diferenciadas con aspecto fibroblástico.
- Capa de células del epitelio pigmentario y células fotorreceptoras. Las células del epitelio pigmentario y el citoplasma de los fotorreceptores están intercalados. En este estadio el ojo aún no está pigmentado debido a la ausencia de melanina en el epitelio pigmentario.
- Capa nuclear externa formada por los núcleos de las células fotorreceptoras.
- Capa plexiforme externa formada por una banda delgada de coloración homogénea.
- Capa nuclear interna compuesta por tres tipos celulares. Una única fila de células horizontales con morfología plana. Una zona intermedia compuesta de células bipolares de pequeño tamaño. Una zona interna de células amacrinas de mayor tamaño con un núcleo de coloración clara y muy poco citoplasma.
- Capa plexiforme interna formada por una banda ancha de coloración homogénea.
- Capa ganglionar formada por células redondas de gran tamaño.
- El cristalino, formado por capas concéntricas de material hialino.
- La córnea, formada por una capa de epitelio que protege al cristalino y que está en contacto con el medio externo.

En el estadio 2, la conformación del ojo es similar a la descrita en el estadio 1, aunque se pueden observar los siguientes cambios en las capas:

- En la capa corioidea se distingue la disposición doble de los fibroblastos. La parte exterior forma la coroides y la interior la esclerótica.
- En el interior de las células del epitelio pigmentario se observa la acumulación de gránulos de melanina.
- En la capa plexiforme externa aparece una monocapa de células cúbicas.
- En la capa nuclear interna se observa una disminución de la densidad celular y por tanto la aparición del espacio intercelular.
- Dentro de la capa plexiforme interna y entre las células de la capa ganglionar aparecen gran cantidad de fibras nerviosas.

En este estadio se observa el inicio del proceso falciforme, por el que el epitelio pigmentario forma un pliegue alrededor del cristalino y da lugar al iris. Desde la capa de fibroblastos que está en contacto con la zona interior de la coroides, emerge una capa de epitelio protector.

En el estadio 3 los gránulos de melanina se distribuyen por todo el citoplasma de las células del epitelio pigmentario y alrededor del cristalino aparece una capa de fibras nerviosas (Figura 9.39).

En el subestadio 4a la córnea aparece rodeada por una capa externa de epitelio, similar a la capa epitelial que recubre toda la superficie del cuerpo de la larva. En la zona interna a esta capa y en contacto con la superficie del cristalino se observa una capa de fibroblastos, la misma que puede observarse rodeando a todo el ojo (coroides). En la zona donde la superficie del ojo está en contacto con el medio externo, entre la capa de epitelio y de fibroblastos, se observan fibras de colágeno laxas y condroblastos (Figura 9.40). En los subestadios 4b y 4c es posible diferenciar la presencia de la matriz extracelular de los condroblastos y las estructuras musculares responsables del movimiento del ojo. Las capas de la

retina que se observan en estos estadios de desarrollo son las mismas que las observadas en individuos juveniles.

En el estadio 5 las características de desarrollo histológico de los ojos son similares a las del estadio anterior, con pequeños cambios principalmente debidos al crecimiento del pez.

#### **9.4. Discusión**

El lenguado senegalés se desarrolla a partir de un huevo pequeño, 0,933-1,027 mm de diámetro (Dinis, 1992), por lo tanto en el momento de la eclosión presentará un desarrollo incompleto de los tejidos, órganos y sistemas, desarrollo que se irá completando de manera gradual y continua a lo largo de la fase larvaria y de la metamorfosis, a fin de adquirir el que será su fenotipo definitivo de juvenil/adulto. Con el fin de facilitar la descripción del desarrollo de las estructuras y la funcionalidad de los diversos órganos en el lenguado senegalés, se establecieron unas etapas de desarrollo marcadas por los cambios morfológicos más significativos, de una manera similar a lo que ya se ha hecho para otras especies de peces planos (Minami, 1982; Al-Maghazachi y Gibson, 1984; Segner et al., 1995). Los distintos estadios de desarrollo se establecieron de acuerdo a ciertas características externas generales, como puede ser la migración del ojo o la torsión de la notocorda, añadiendo además otros criterios como el desarrollo de los radios de las aletas y la pigmentación del cuerpo y de los ojos, para de este modo facilitar la clasificación.



La clasificación en estadios de desarrollo es un método más adecuado para caracterizar el desarrollo larvario, en comparación con otros criterios utilizados frecuentemente, como pueden ser días desde la eclosión, grados-día desde la eclosión, la longitud o el peso de la larva, ya que el estadio de desarrollo es independiente de parámetros como las condiciones de cultivo, la alimentación o la temperatura del agua utilizada en cada instalación. En este trabajo se ha observado que la dispersión de los distintos estadios de desarrollo para un mismo día de muestreo aumentó en paralelo a la edad de la larva. Este fenómeno, que ya ha sido descrito como habitual en las larvas de peces, es especialmente evidente en los peces planos (Fukuhara, 1986). También hay que destacar de esta experiencia, que el intervalo en el tiempo de eclosión fue mayor de lo esperable y en consecuencia, es probable que esta mayor dispersión inicial afectase posteriormente a la amplia dispersión de estadios de desarrollo observada a medida que las larvas iban desarrollándose.

Los patrones de desarrollo observados en las larvas del lenguado senegalés son similares a los descritos para otras especies de peces planos (Al-Maghazachi y Gibson, 1984; Fukuhara, 1986, 1988). Generalmente las diferentes pautas de desarrollo observadas en larvas de peces marinos se deben a factores como el tamaño del huevo, la composición del vitelo, el periodo de incubación y al grado de funcionalidad de los órganos y sistemas en el momento de la eclosión (Falk-Petersen, 2005), por lo tanto, especies con afinidades en estos factores tenderán a seguir patrones de desarrollo similares. El llamado estadio lecitotrófico, en el lenguado senegalés es relativamente corto, de aproximadamente 60 °día, tal y como corresponde a las larvas que se desarrollan a partir de huevos pequeños. El inicio de la alimentación exógena tiene lugar en

el subestadio 1c, justo antes de la completa reabsorción del vitelo que se observa en el estadio 2. Este periodo de transición es muy corto comparado con otras especies (Falk-Petersen, 2005). Sin embargo, aunque los patrones generales de desarrollo parecen similares a los de la mayoría de larvas de peces marinos que ya se han descrito, en el lenguado senegalés se aprecian algunas diferencias ontogénicas que probablemente pueden tener algún tipo de relación con el ambiente en el que habitan los individuos adultos y salvajes, principalmente esteros de aguas templadas donde puede haber cambios bruscos en la salinidad, y de su comportamiento claramente nocturno, bentónico y omnívoro.

Después de la eclosión, las larvas de lenguado senegalés, al igual que ocurre con otras larvas provenientes de huevos pequeños, presentan mayoritariamente natación pasiva con contracciones ocasionales que les permiten nadar, pero durante la mayor parte del tiempo se mantienen flotando en la columna de agua. En esta fase del desarrollo la epidermis es prácticamente el único componente de la piel, ya que la dermis está ausente y solamente se observa un gran espacio subdérmico. Este espacio subdérmico parece que está relacionado con la flotabilidad neutra del eleuteroembrión y la larva dentro de la columna de agua, cuando aún no tienen desarrolladas completamente las capacidades locomotoras (desarrollo de las aletas definitivas) y la vejiga natatoria está en una fase muy inicial del desarrollo.

La piel de las larvas de los peces teleósteos se ha descrito como una estructura que ofrece protección, así como una estructura con importante función osmoreguladora, de intercambio de gases y sensorial (Roberts et al., 1973; Hiroi et al., 1998). En este estudio se ha observado la presencia de células císticas, también llamadas saculares o sacciformes, que aparecen solamente

durante los primeros estadios de desarrollo y que desaparecen posteriormente, siendo sustituidas por células mucosas. Las células císticas son características de larvas premetamórficas y han sido descritas en detalle en la larva de *H. hippoglossus* (Ottesen y Olafsen, 1997). Estos autores indican que probablemente el papel principal de estas células sea la producción de ciertas sustancias repelentes durante los estadios tempranos de desarrollo, cuando la barrera epitelial de la piel aún es débil. La desaparición de las células císticas, y por tanto la desaparición de las funciones beneficiosas de sus secreciones, se suple con la aparición de las secreciones de las células mucosas y con el aumento del grosor de la epidermis en las larvas metamórficas y postmetamórficas. .

Las larvas de especies marinas son hiposmóticas comparadas con el ambiente en el que viven, por tanto su organismo tiende a sufrir pérdidas de agua e incorporación de sales (Guggino 1980a, 1980b; Kaneko et al., 1995; Finn et al., 2002). En peces teleósteos, las células encargadas de mantener el equilibrio osmótico entre el organismo y el ambiente son las células cloruro, ricas en mitocondrias y en bombas sodio-potasio (Jürs y Bastrop, 1995; Evans et al., 1999). En este estudio se detectó la presencia de células cloruro distribuidas por toda la superficie corporal desde el momento de la eclosión, más tarde se concentraron en la zona cefálica y por último desaparecieron casi por completo para concentrarse exclusivamente en las branquias. Esta variabilidad en densidad y localización de las células cloruro a lo largo del desarrollo ha sido descrita en varias especies de peces teleósteos (Hiroi et al., 1998; Varsamos et al., 2002), aunque la sincronización difiere entre ellas (Rombough, 2004). Generalmente primero aumentan en número hasta un cierto umbral y después decrecen, su desaparición de la piel se acompaña de su aparición en branquias.

Por lo tanto, parece ser que este umbral de inflexión está relacionado con el desarrollo de estas estructuras branquiales (Rombough, 2004). Así, la piel será el órgano encargado de la osmorregulación en los estadios tempranos de desarrollo (Wales y Tytler, 1996; Hiroi et al., 1998) pero a medida que las branquias van desarrollándose la desplazarán de sus funciones.

Las branquias del lenguado senegalés en el momento de la eclosión no son funcionales, lo que implica que el intercambio de gases se ha de realizar mediante un órgano no especializado. La piel es el órgano encargado de asumir este intercambio debido a que el pequeño tamaño de la larva produce un coeficiente superficie/volumen que permite una difusión de oxígeno hacia el interior superior a la demanda metabólica (Rombough, 2004). Otro factor que favorece este intercambio es un epitelio epidérmico poco desarrollado, por lo que la difusión de gases encuentra pocos obstáculos (Rombough, 2004), a lo que en el caso de la larva del lenguado senegalés hay que sumar la práctica ausencia de dermis. No obstante, hay que considerar que el intercambio no es tan elevado como cabría esperar, debido principalmente a la resistencia que ofrece el espacio subdérmico (Rombough, 2004). A medida que la larva se desarrolla, las demandas metabólicas crecen más rápido que la superficie de intercambio, por lo que la piel debe ir perdiendo gradualmente su función en el intercambio de gases para que se de la transición de la respiración cutánea a branquial, el momento de la transición depende de la especie (Rombough, 2004), en el caso del lenguado senegalés esta transición se inicia en el estadio 3, cuando empiezan a observarse las primeras laminillas branquiales emergentes.

Después de la metamorfosis, la piel se diferencia en las estructuras juveniles definitivas. En la mayoría de las especies de peces planos cultivadas,

como pueden ser *H. hippoglossus* (Campinho et al., 2006), *Pseudopleuronectes americanus* (Murray et al., 2003) o *P. platessa* (Roberts et al., 1973), la metamorfosis también está asociada a cambios en la piel, de modo que la epidermis delgada de las larvas recién eclosionadas se transforma, en larvas postmetamórficas, en una piel más compleja, compuesta de epidermis, dermis e hipodermis. En el caso del lenguado senegalés no se observaron estos cambios en la piel, ya que en los individuos postmetamórficos la dermis siguió formada solamente por algunos fibroblastos, sin presentar una estructura tan organizada como en las otras especies. Tras el final de la metamorfosis tampoco se observó la formación de escamas, posiblemente debido al escaso desarrollo de las estructuras dérmicas. Aunque la formación de escamas es un criterio usado para indicar el inicio del periodo juvenil (Neuman y Able, 2002), la ausencia de escamas tras la metamorfosis ya ha sido observada en otras especies de peces planos (Able y Lamonaca, 2006). Youson (1988), indicó que la metamorfosis está claramente relacionada con los cambios morfológicos, fisiológicos y de comportamiento, incluyendo los mecanismos de alimentación y digestión, de tal manera que el fin de la metamorfosis puede determinarse en función del momento en que el pez es capaz de reanudar, comenzar o alterar el tipo de alimentación, y no por la adquisición de una serie de caracteres externos, que no son evidencia suficiente. Por lo tanto, en el caso del lenguado senegalés, la aparición de las escamas no indicaría el final de la metamorfosis que tampoco guardaría relación con el inicio del periodo juvenil.

Las branquias de los peces adultos son un órgano multifuncional donde se da el intercambio de gases (Jones y Randall, 1978), la osmorregulación (Evans et al., 1999) y la excreción del nitrógeno residual (Randall et al., 1999). A medida

que la larva va creciendo y desarrollándose, las funciones de intercambio de gases y osmorregulación se van transfiriendo desde la piel a las branquias, esta transferencia va teniendo lugar a medida que las branquias van adquiriendo sus características definitivas (Rombough, 2004). Su desarrollo, en el lenguado senegalés es similar al de otras larvas de peces marinos (Pittman et al., 1990; Segner et al., 1994, 1995; Hiroi et al., 1998; Schreiber y Speaker, 1999). La observación de que hasta el subestadio 4a las estructuras branquiales del lenguado senegalés no aparecen completamente formadas, confirman que estas estructuras no tienen un papel relevante en la respiración durante los primeros estadios. Probablemente, el desarrollo de las laminillas respiratorias en el subestadio 4a pueda corresponder a un periodo importante del crecimiento de la larva y por tanto a la necesidad de esta de aumentar su eficiencia respiratoria. De todas maneras, comparado con otras especies de peces planos, el desarrollo de las branquias del lenguado senegalés es ligeramente más rápido (Pittman et al., 1990; Segner et al., 1994), lo que puede también asociarse a la mayor rapidez de crecimiento. El intercambio de gases se da en las laminillas, en cambio el intercambio iónico se da a través de las células cloruro que se encuentran en mayor número en los filamentos branquiales (Rombough, 2004). Así, las branquias del lenguado senegalés primero adquirirán su capacidad para intercambiar iones y después para el intercambio de gases, ya que en ellas se observa la presencia de células cloruro antes de la completa formación de las laminillas, este hecho también ha sido demostrado en otras especies de peces marinos (Li et al., 1995; Hiroi et al. 1998; Varsamos et al., 2002). El aumento paulatino de la presencia, en las branquias del lenguado senegalés, de células cloruro está relacionado con la adquisición por parte del juvenil de la

característica eurihalina, ya que estas células secretarán activamente las sales y los peces podrán mantenerse en ambientes altamente salinos.

Comparado con el resto de arcos branquiales, la pseudobranquia parece que completa su desarrollo y es funcional en el subestadio 4b. Teniendo en cuenta que se postula que su función principal es la de proveer de sangre oxigenada a estructuras oculares, como la rete de la coroides y a la retina (Waser y Heisler, 2004), parece que el desarrollo de la pseudobranquia acompaña, en el caso del lenguado senegalés, al desarrollo de las estructuras oculares.

Junto a la cavidad branquial y alrededor de la aorta ventral de las larvas del lenguado senegalés se observa la aparición, en el estadio 3, de un único folículo tiroideo. Hasta el estadio 5 se distingue un progresivo aumento en el número de folículos y en el contenido de coloide. La función principal de la glándula tiroides es la producción y secreción de las dos hormonas tiroideas, triiodotironina y tetraiodotironina. Las funciones de estas hormonas en la organogénesis y en la metamorfosis están bien establecidas, en el caso concreto de los peces planos son de gran importancia en la adquisición del comportamiento bentónico (Inui et al., 1985; Miwa y Inui, 1987; Miwa *et al.*, 1988; Schreiber y Specker, 1998). En este trabajo también se evidencia la importancia de estas hormonas en la regulación de la metamorfosis, ya que en el estadio posterior a la aparición del primer folículo las larvas del lenguado senegalés inician la migración del ojo izquierdo, a partir de ese momento el número de folículos y su tamaño aumentan en paralelo a la evolución de la metamorfosis y al desarrollo de los distintos órganos y sistemas. Se han obtenido resultados similares a los de este trabajo para otras especies de peces planos (Tanaka et al., 1995; Padrós y Crespo, 1996) y concretamente también para el

lenguado senegalés (Ortiz Delgado et al., 2006). Otras funciones en las que también intervienen las hormonas tiroideas son la conducta migratoria, la actividad del sistema nervioso central, la adaptación estacional, la tolerancia a los cambios de temperatura, la respiración y la osmorregulación (Sage, 1973; Honma *et al.*, 1977; Schreck y Scanlon, 1977), funciones requeridas no solo para llevar a cabo la metamorfosis y el desarrollo de los distintos órganos, sino también para poder adaptarse a cambios en el ambiente. Esta adaptación a los cambios ambientales permitirá a las larvas del lenguado senegalés trasladarse desde el ambiente marino, relativamente estable, a los estuarios, donde las temperaturas, las salinidades y los niveles de oxígeno disueltos en el agua pueden sufrir grandes fluctuaciones y situarse en niveles extremos.

Generalmente, las diferencias en las características del hábitat llevan a los peces a soportar diferentes niveles de estrés fisiológico (Mandon, 2002). En el caso del lenguado senegalés, en el momento que emprende el desplazamiento desde el ambiente marino al ambiente estuárico, está preparado para adaptar sus funciones vitales al nuevo hábitat, por lo tanto, el estrés al que se verá sometido será mínimo. El tejido interrenal, que es apreciable histológicamente desde el subestadio 4a, es el responsable de la síntesis de cortisol, hormona que junto con la prolactina son los factores endocrinos más importantes en el control de las bombas sodio-potasio presentes en las células cloruro (McCormick, 1995; Young et al., 1995; Evans, 2002), a su vez, el cortisol provoca un aumento en el número de estas células (Richman y Zaugg, 1987; McCormick, 1990), aumento que en el lenguado senegalés se observa en branquias a partir del subestadio 4a. De este modo, la presencia del tejido interrenal asegura la presencia de cortisol, que interviene en el control de los procesos osmoregulatorios (Richman y Zaugg,



1987) y permite una mayor adaptabilidad a los cambios en la salinidad ambiental. Las células cromafines, se observan a partir del subestadio 4a mezcladas con el tejido interrenal y alrededor de la vena cardinal, son responsables de la síntesis, almacenamiento y rápida liberación de las catecolaminas, adrenalina y noradrenalina, como respuesta a situaciones que inducen a algún tipo de estrés agudo (Pickering, 1993). Por lo tanto, la presencia de estas células puede indicar que estas larvas ya son capaces de hacer frente a las situaciones de estrés y adaptabilidad al entorno.

Ya se ha visto que son muchas las hormonas que interactúan para iniciar y completar la metamorfosis (tiroideas, prolactina, cortisol) (Inui et al., 1994). La insulina, aunque no se encuentre dentro de este grupo, se ha demostrado que es un promotor del crecimiento debido a su actividad anabólica (Plisetskaya *et al.*, 1984; Mommsen y Plisetskaya, 1991) y por lo tanto será necesaria en las primeras etapas del desarrollo para que la larva pueda conseguir el máximo crecimiento posible. El islote de Langerhans es el responsable de la producción de insulina, por lo tanto ha de ser funcional antes de la completa reabsorción del vitelo, ya que juega un papel importante en el metabolismo del glucógeno y en las actividades del páncreas exocrino durante la primera alimentación (Tanaka et al., 2005). En el lenguado senegalés se detecta un único islote de Langerhans ya desde el estadio 1, circunstancia que también se observa en larvas de *G. morhua* recién eclosionadas (Falk-Petersen, 2005).

Entre todos los órganos y sistemas del lenguado senegalés descritos hasta la fecha, el desarrollo del sistema digestivo ha recibido una atención preferente (Sarasquete et al., 1996; Ribeiro et al., 1999; Arellano et al., 1999, 2001a, 2001b, 2002; Martínez et al., 2004), probablemente debido a que para el diseño de

dietas de transición a alimento inerte y de crecimiento adecuadas es necesario de un conocimiento apropiado del desarrollo del digestivo, así como de la evolución en la capacidad de producción de enzimas (Hamlin et al., 2000). En los trabajos anteriormente citados, se describe de forma detallada el desarrollo del trato digestivo de las larvas en estadios posteriores a la reabsorción del vitelo, pero no se describen las estructuras vitelinas ni su evolución, por lo que se ha considerado adecuado incluir esta descripción en el presente trabajo, así como algunos elementos del desarrollo de la cavidad orobranquial, y de este modo completar la descripción del desarrollo del sistema digestivo. En este trabajo se ha observado la existencia de un saco vitelino monocameral. En esta estructura, los glóbulos lipídicos se encuentran libres en medio de la masa vitelina y en muchos casos no parece que contacten con la superficie del sincitio. Es posible que esta disposición de los glóbulos pueda limitar el acceso de la larva a los lípidos que contienen hasta casi el final del periodo lecitotrófico, cuando el vitelo ha sido significativamente reabsorbido y el sincitio puede acceder a estos lípidos. Esta aparente limitación de la disponibilidad de los lípidos del vitelo podría entenderse desde el punto de vista de una priorización en la utilización de las reservas proteicas para el crecimiento somático, aunque no parece responder a las necesidades del rápido desarrollo de estructuras como los ojos, en los que el desarrollo de membranas, especialmente de la retina, requeriría a priori de un adecuado aporte de lípidos. En todo caso, la rápida utilización de las reservas vitelinas por parte de las larvas de lenguado senegalés, hace que el periodo hasta que los glóbulos lipídicos son accesibles al sincitio sea realmente muy corto.

En este estudio se observó el desarrollo de los barbillones en los estadios que acompañan al cambio de vida pelágica a bentónica y por lo tanto, se desarrollarían de forma sincrónica al cambio de alimentación. Los barbillones son estructuras dérmicas que utilizan los peces de vida bentónica para empujar el sustrato durante la alimentación y así poder encontrar alimento enterrado (Lombarte y Aguirre, 1997; Kiyohara et al., 2002). Sin embargo, los estudios centrados en estas estructuras están basados en especies bentónicas pero no planas, que poseen un único par de barbillones largos, en cambio, en el lenguado senegalés, así como en toda la familia de soleidos, estas estructuras son más cortas y se encuentran presentes en elevado número, por lo que esta variabilidad morfológica podría determinar una variabilidad en su funcionalidad. A este hecho hay que añadir la ausencia de papilas gustativas en los barbillones del lenguado senegalés que ha finalizado la metamorfosis, parecería indicar que, a diferencia de lo que se observa en otras especies (Kiyohara et al., 2002), las funciones gustativas en las larvas y pre-juveniles de esta especie no se localizan en estas estructuras, sino que se ubican en otras zonas, como puede ser la cavidad orofaríngea.

El desarrollo del tejido hematopoyético en las larvas del lenguado senegalés es un proceso tardío y muestra algunas similitudes con el desarrollo que se observa en otras especies de peces marinos (Chantanachookhin et al., 1991) o de peces planos como *S. maximus* (Padrós y Crespo, 1996). Cunha et al. (2003) describieron el patrón de aparición de los órganos hematopoyéticos en el lenguado senegalés, en este estudio previo, estos autores describieron la misma secuencia de desarrollo (riñón-bazo-timo) que la que se presenta en este capítulo. Las células hematopoyéticas del riñón son el primer órgano linfoide

que aparece en un gran número de especies de peces (Padrós y Crespo, 1996). En el lenguado senegalés se empiezan a diferenciar en el estadio 2, aunque se pueden observar en la región del riñón desde el momento de la eclosión. Probablemente derivan de la masa de células intermedias que se observa durante el periodo embriónico (Willet et al., 1999). La línea eritrocitaria es la primera que se desarrolla, así, los eritrocitos (aunque inmaduros) se pueden observar ya en el estadio 1, desarrollándose rápidamente tanto en número como en grado de madurez. Este desarrollo puede estar relacionado con el desarrollo coordinado de las estructuras circulatorias, respiratorias y osmoregulatorias que se da en los siguientes estadios. En el estadio 2, el bazo aparece como una masa esférica de células poco diferenciadas y con propiedades eritropoyéticas. Más tarde en el desarrollo, tanto el riñón como el bazo se vuelven linfoides. El timo no se observó hasta el subestadio 4a, con los timocitos localizados en la zona más externa y los linfoblastos en la zona más interna, hasta el estadio 5 no se pudieron observar ocasionalmente las células granulares y mieloides. Como ya fue indicado por Cunha et al. (2003), las altas tasas de supervivencia del lenguado senegalés durante el periodo larvario, pueden ser atribuidas a un desarrollo relativamente acelerado del sistema inmune durante los estadios más tempranos.

El corazón aparece cuando las necesidades nutricionales y de oxígeno no pueden ser satisfechas solo con la difusión, debido principalmente al aumento de volumen o al aumento de las demandas metabólicas por parte del organismo (Pelster y Burggren, 1996). En el caso del lenguado senegalés, el desarrollo del corazón es similar al descrito para otras especies de peces planos como *S. maximus* (Padrós, 1994). En el momento de la eclosión el corazón no está

segmentado, pero es igualmente funcional (Hu et al., 2000). La formación de las cuatro cámaras (seno venoso, atrio, ventrículo y bulbo arterioso) y de las válvulas (seno-atrial, atrio-ventricular y ventrículo-bulbar) se alarga hasta el subestadio 4a. Como pasa en *S. maximus* (Padrós, 1994), la estructura miocárdial final se forma muy pronto en el desarrollo.

En el momento de la eclosión, la anatomía sensorial de la larva se parece poco a la del adulto, lo que implica que las capacidades sensoriales son pobres al principio y van mejorando paulatinamente hasta que los sistemas sensoriales están completos (Fuiman et al., 2004). En el caso del lenguado senegalés, el desarrollo del ojo es marcadamente muy rápido, ya que la estructura retinal en capas se puede distinguir desde el subestadio 1b. Se sabe que en algunas larvas marinas, como *C. harengus*, la retina ya está diferenciada en el momento de la eclosión (Sandy y Blaxter, 1980), pero en la mayoría de especies de peces planos el desarrollo es más lento (Sandy y Blaxter, 1980; McFarlane et al., 1991; Kvenseth et al., 1996). En el caso del lenguado senegalés, el rápido desarrollo del ojo puede ser la causa del rápido crecimiento de las larvas y de la temprana metamorfosis y migración hacia el fondo, ya que la visión en las larvas acabadas de eclosionar es fundamental para el reconocimiento del alimento y la reacción frente a los depredadores (Blaxter, 1986). El comportamiento cazador de las larvas del lenguado senegalés, parece ser que está relacionado con la visión solo en las etapas tempranas del desarrollo y una vez la larva se ha vuelto bentónica, los estímulos más importantes para la depredación son la quimiorrecepción y la mecanorrecepción, como ya ha sido indicado por Batty y Hoyt (1995) en el caso de *P. platessa*. Cañavate et al. (2006) observaron que hasta el día 8 después de la eclosión las larvas eran incapaces de alimentarse en la oscuridad, pero más tarde

en el desarrollo, las larvas ya mostraron los típicos hábitos de alimentación nocturna (Bayarri et al., 2004). Además, una vez la larva se ha vuelto bentónica, es capaz de alimentarse de presas muertas, confiando seguramente en los estímulos químicos, como lo demuestra la tendencia actual de alimentar a las larvas del lenguado senegalés, a partir de aproximadamente el día 12 después de la eclosión, de nauplios de *Artemia* enriquecidos y posteriormente congelados (muertos). Esta técnica resulta muy útil debido a que el enriquecimiento en ácidos grasos se conserva y a que las larvas se alimentan normalmente de los nauplios de *Artemia* muertos (Morais et al., 2006; observación personal, 2006).

En la larva del lenguado senegalés se observa la presencia, desde el estadio 1 de los canales semicirculares en el oído interno, así como de las máculas sensoriales desde el estadio 2. La presencia de estos órganos indica, como sucede en la mayoría de especies, que desde los estadios tempranos de desarrollo las larvas son capaces de detectar sonido, movimiento y tener percepción de su equilibrio (Blaxter, 1986, 1988). La vejiga natatoria, que se utiliza para aumentar los estímulos auditivos y para mantener la flotabilidad de la larva (Falk-Petersen, 2005) solo está presente en el lenguado senegalés hasta el subestadio 4a. Una vez situados en el fondo, las larvas y/o juveniles ya no necesitaran la vejiga natatoria para mantener la flotabilidad. Observaciones similares para otras especies de peces planos han sido publicadas por Cousin y Baudin-Laurencin (1985).

Como se ha comentado anteriormente, la piel de las larvas también tiene función sensorial (Roberts et al., 1973; Hiroi et al., 1998). En la piel del lenguado senegalés se observan neuromastos libres desde el momento de la eclosión, y como en otras larvas recién eclosionadas que no tienen pigmento en los ojos,

incluyendo la mayoría de especies de peces planos (Otsuka, 2003), los neuromastos se concentran en la zona cefálica. En los peces planos, el número inicial y la localización de los neuromastos parece ser específico de cada especie y no muestra correlación con el estadio de desarrollo en el momento de la eclosión (Otsuka, 2003). Aunque el desarrollo del ojo se da muy rápido en la larva del lenguado senegalés, los neuromastos podrían desempeñar un importante papel en las relaciones tempranas entre la larva y el medio externo, y más tarde, una vez que las larvas cambian sus hábitos a nocturnos y bentónicos, también serían importantes en la quimio y mecanorecepción de las presas (Blaxter, 1986; Otsuka, 2003).

Con la adquisición de la asimetría bilateral, la morfología neural y del cráneo sufren una compleja modificación (Finger, 1987, 1988), pero las asimetrías cerebrales derivadas de este proceso no son tan pronunciadas como cabría esperar (Kotrschal et al., 1998). El desarrollo del cerebro en el lenguado senegalés es un proceso rápido, ya que desde los primeros días del desarrollo (estadios 1 y 2) se pueden observar los lóbulos ópticos y los lóbulos olfativos, estructuras que necesariamente han de ser funcionales en el momento del inicio de la alimentación exógena. La pituitaria por su parte, también está presente en las etapas tempranas de desarrollo, debido principalmente a su función como productora de las hormonas que estimulan a los órganos endocrinos, esenciales, como ya se ha comentado, para el correcto desarrollo de la metamorfosis. Más tarde en el desarrollo, el cerebelo puede que también intervenga en la función neural, ya que desempeña un papel importante en el control y en la coordinación de los movimientos, y también en el seguimiento de los objetos que se mueven alrededor del pez (Paulin, 1993).

Concluyendo, los mecanismos básicos del desarrollo de los órganos de la larva del lenguado senegalés son similares a los que se describen para larvas de peces teleósteos (O'Connell, 1981; Chantanachookhin et al., 1991; Falk-Petersen y Hansen, 2001; Varsamos et al., 2002) y más particularmente para larvas de peces planos (Minami, 1982; Al-Mag hazachi y Gibson, 1984; Fukuhara, 1986, 1988; Ottesen y Olafsen, 1997). Las diferencias más remarcables que se observan entre ellos se basan en el tiempo concreto en el que aparecen y se desarrollan los distintos órganos y sistemas entre las diferentes especies, y esto a su vez depende de la talla del huevo y de la larva recién eclosionada, de las reservas endógenas de vitelo y de la ecología de la especie (Hoehne-Reitan y Kjorsvik, 2004). El alto y rápido consumo de las reservas endógenas de vitelo de la larva del lenguado senegalés le permiten un rápido desarrollo de los sentidos, principalmente de la visión, y del sistema digestivo, con lo que la alimentación exógena se inicia tempranamente en el desarrollo, de tal modo que la larva puede acelerar al máximo su crecimiento e iniciar, lo más rápido posible, la metamorfosis. Es en este punto cuando el desarrollo de la larva ya no depende de las reservas endógenas de vitelo y pasa a ser dependiente de la ecología de la especie. Con la metamorfosis, la larva ha de adquirir el fenotipo del adulto para adaptarse al que será su nuevo hábitat. La larva se sitúa en el fondo y el consumo de alimento se reduce a menos del 20% de su peso corporal (Cañavate et al., 2006). En este momento su principal objetivo parece no ser el crecer lo más rápido posible, ya que no es tan vulnerable a los depredadores, ha superado la talla pequeña, se ha vuelto plano y se encuentra enterrado en el fondo arenoso de los estuarios, donde de por sí, el número de depredadores es menor. En los estuarios se encuentra con mayor cantidad de alimento y la variedad de sus presas aumenta,



alimentándose de crustáceos, moluscos, poliquetos y tal vez alguna presa muerta. Cambia su comportamiento diurno a nocturno y se vuelve capaz de tolerar amplios rangos de salinidades y temperaturas.

Teniendo en cuenta que el adecuado desarrollo y diferenciación dependen de la alimentación y de las condiciones ambientales (Falk-Petersen, 2005), en este trabajo se siguieron las pautas alimentarias y los parámetros físico-químicos considerados óptimos para la especie. Por otro lado, no se detectó ningún problema patológico durante el cultivo experimental de las larvas. Por todos estos motivos, la clasificación del desarrollo larvario en estadios y subestadios empleada en este capítulo, así como las características organogénicas y morfológicas que se dan en cada uno de ellos, pueden ser utilizados como guía para determinar el normal crecimiento de las larvas de esta especie bajo condiciones intensivas de cultivo.

Figura 9.1. Arcos branquiales y filamentos primarios (Estadio 2). Se observa el inicio de la condrogénesis (★), algunas fibras musculares (▶) y células cloruro dispersas (◆).

Figura 9.2. Esbozos de las laminillas branquiales en el segundo y tercer arcos branquiales (Estadio 3). Se observa el aumento en el número de células cloruro en los filamentos (▶).

Figura 9.3. Estructura branquial (Subestadio 4b). Se observa la presencia de condroblastos en el eje de los filamentos (★), células cloruro entre las laminillas (▶) y la estructura típica de las células pilar (◆).

Figura 9.4. Estructura típica de la branquia post-metamórfica (Estadio 5).

Figura 9.5. Pseudobranquia (Estadio 5). Se observa la presencia de cuatro filamentos (▶) rodeados por una aglutinación de laminillas y estructuras vasculares. También se observa un quinto filamento menos desarrollado (■).

Figura 9.6. Presencia de un único Islote de Langerhans (★) (Estadio 1) entre los acinis del páncreas endocrino (●).

Figura 9.7. Detalle del Islote de Langerhans cuando ha aumentado su tamaño (Subestadio 4a).

Figura 9.8. Aparición de diversos Islotes de Langerhans (★) de menor tamaño (Subestadio 4c) y de los gránulos de zimógeno (▶) en el páncreas endocrino.

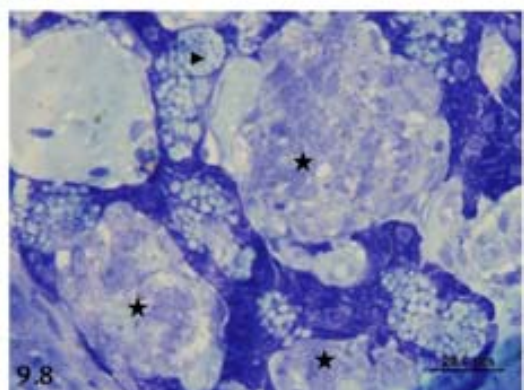
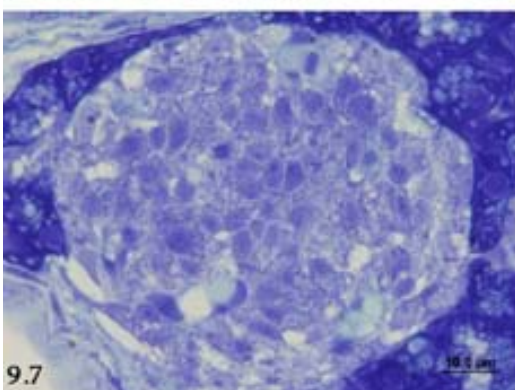
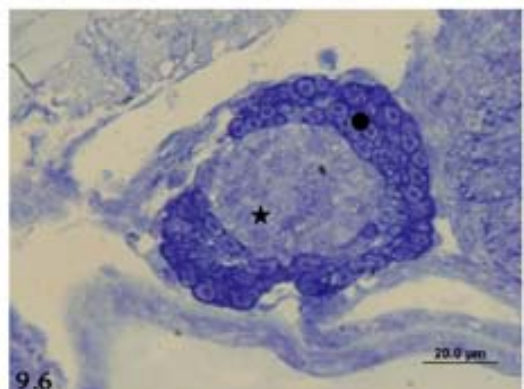
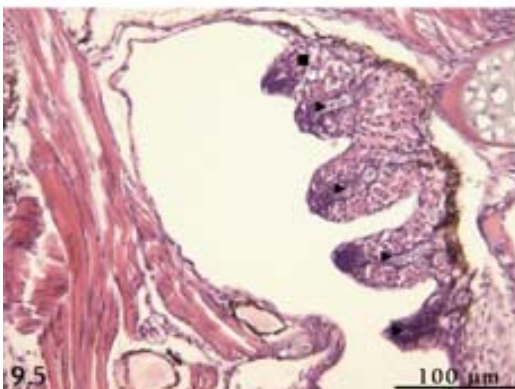
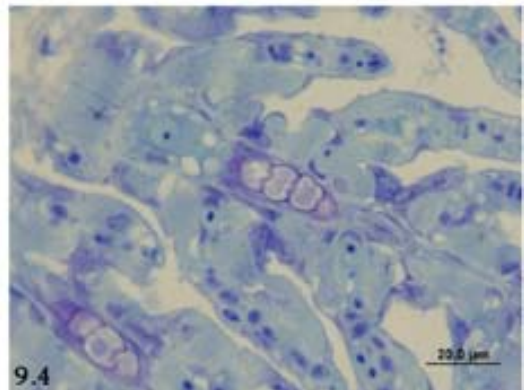
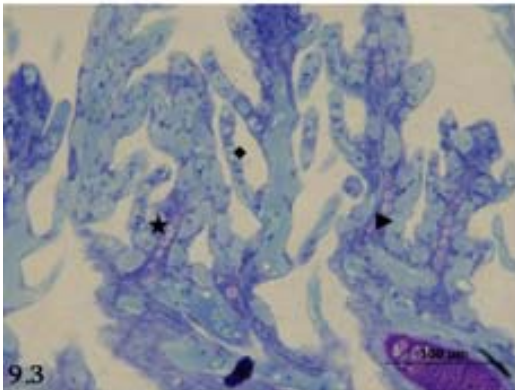
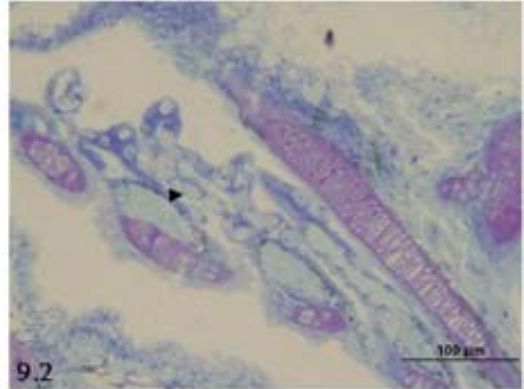
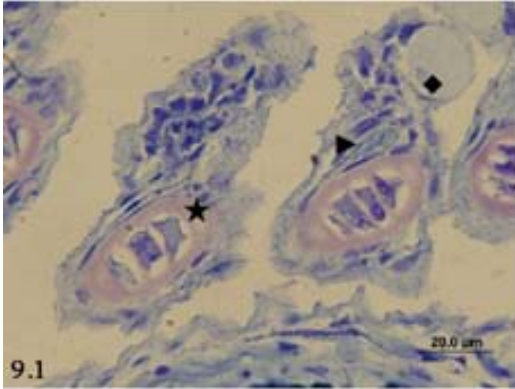


Figura 9.9. Glándula tiroides (Estadio 3) compuesta por cuatro folículos (★) llenos de material hialino.

Figura 9.10. Glándula tiroides (Estadio 5) en la que se observa el aumento en el número de folículos y en la cantidad de coloide de su interior.

Figura 9.11. Región craneal del riñón (Estadio 2). Se observa la cápsula de Bowman (▶) que engloba el espacio de Bowman (●) y el glomérulo (★). Alrededor se observan células hematopoyéticas poco diferenciadas.

Figura 9.12. Detalle del riñón anterior (Subestadio 4a). Se observa el amplio espacio de Bowman (●), la torsión de los túbulos pronéfricos (■) y las células hematopoyéticas (★).

Figura 9.13. Sección tubular del conducto pronéfrico (Subestadio 4a).

Figura 9.14. Aspecto general de la región posterior del riñón (Subestadio 4c). Se observa la aparición de los túbulos mesonéfricos (●) y entre ellos tejido hematopoyético (★).

Figura 9.15. Región posterior del riñón (Estadio 5) en la que se observan las nefronas mesonéfricas (★) completamente formadas.

Figura 9.16. Aparición del bazo (Estadio 2), compuesto por agregados de células hematopoyéticas poco diferenciadas y algún capilar sanguíneo (▶).

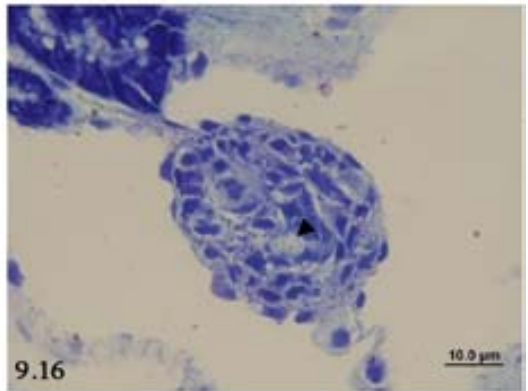
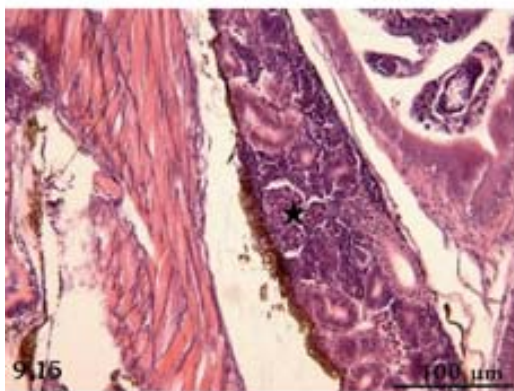
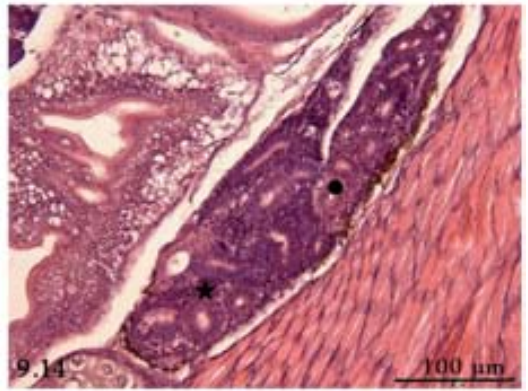
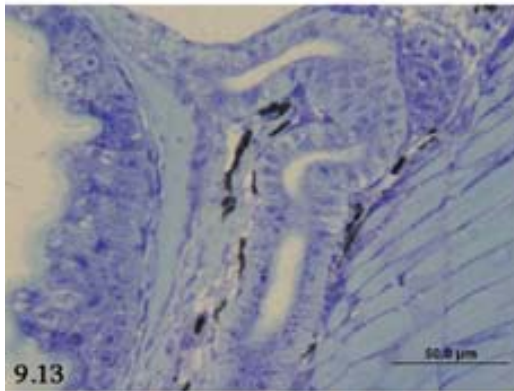
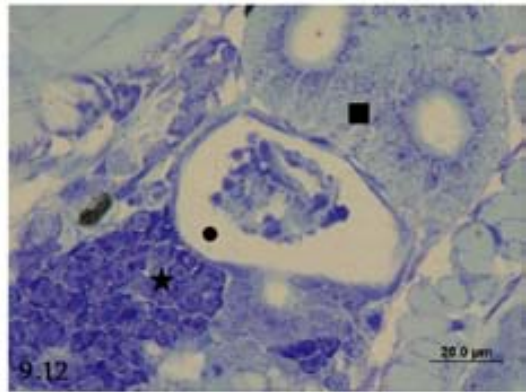
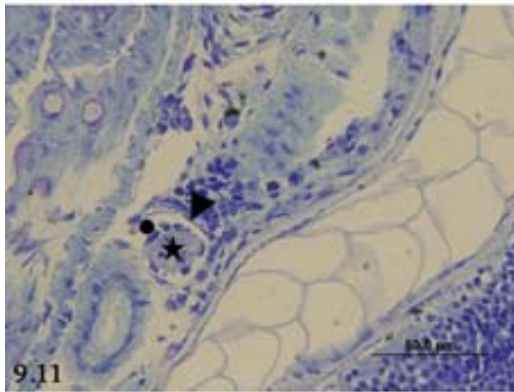
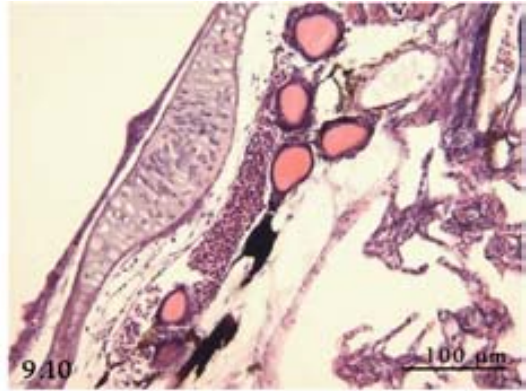


Figura 9.17. Bazo con morfología ovoide (Estadio 3), en su interior se observan células hematopoyéticas (★) y eritrocitos (▶).

Figura 9.18. Bazo con morfología elíptica (Subestadio 4b), en él se aprecian pequeñas zonas de tejido linfoide (■), tejido hematopoyético (★) y elipsoides esplénicos (▶).

Figura 9.19. Detalle del timo (Subestadio 4a) en el que se observan células tímicas indiferenciadas (■) y células hematopoyéticas (★).

Figura 9.20. Corazón con morfología tubular (Estadio 1) y formado por una membrana endocardial (↔) y una miocardial (▶).

Figura 9.21. Aspecto general del corazón (Estadio 2). Se observa el seno venoso (SV), el atrio (A), el ventrículo (V) y el bulbo arterioso (BA).

Figura 9.22. Corazón (Estadio 3). Se observan las trabéculas en el ventrículo (▶) y un aumento en el número de eritrocitos maduros (↔).

Figura 9.23. Corazón (Subestadio 4a). Se observa la conexión entre la aorta ventral y el seno venoso (★) y la proliferación de las trabéculas en el ventrículo (▶).

Figura 9.24. Corazón (Subestadio 4b). Aparecen las trabéculas en el atrio (↔) y las del ventrículo proliferan extensamente (▶). Se observan gran cantidad de eritrocitos maduros (●).

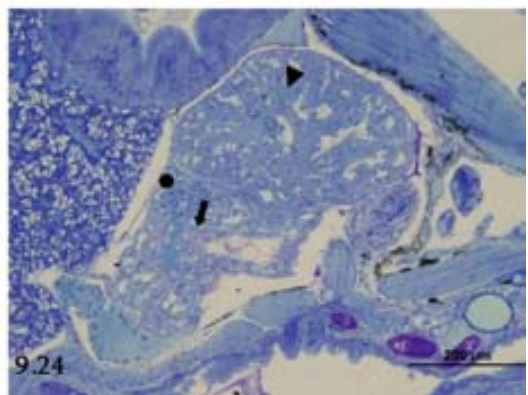
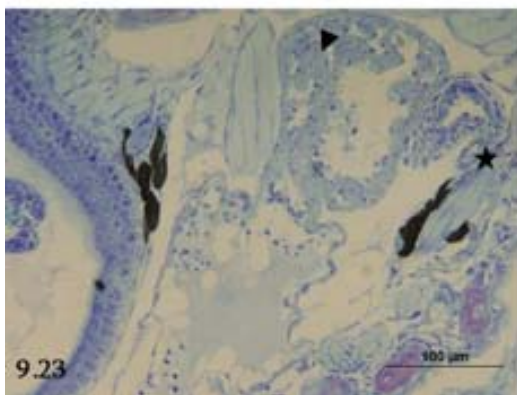
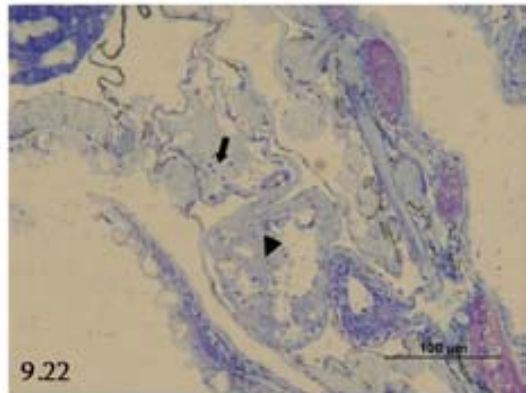
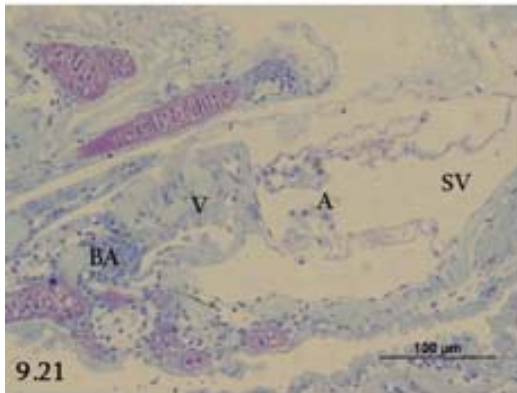
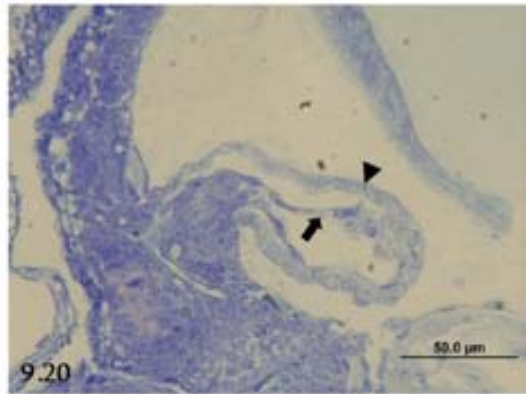
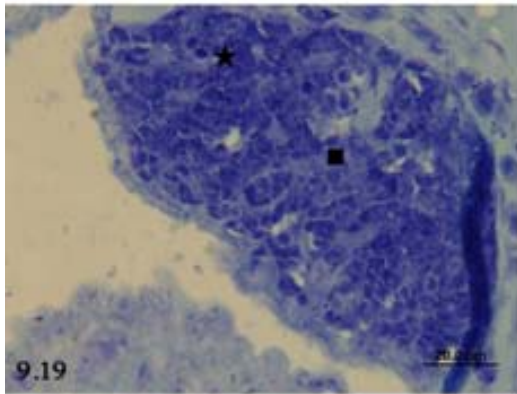
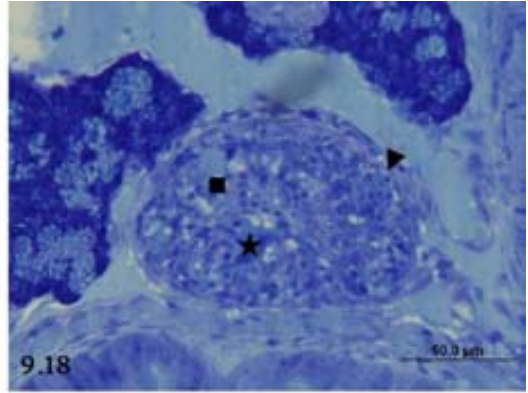
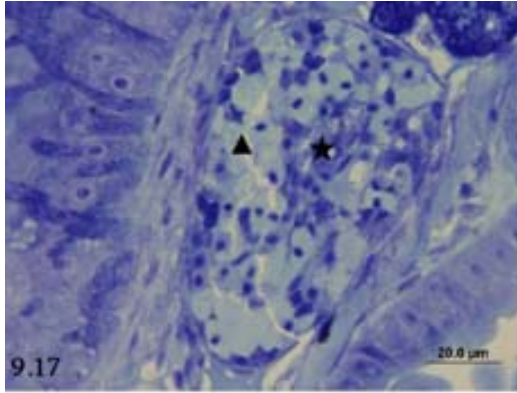


Figura 9.25. Corazón (Subestadio 4b). Se observa la válvula atrio-ventricular (★), las travéculas del atrio (▶) y gran cantidad de eritrocitos libres (●).

Figura 9.26. Corazón (Estadio 5). Detalle del bulbo arterioso y su continuación con la aorta ventral (➡). Se observa el tejido conjuntivo elástico que rodea al bulbo arterioso (★).

Figura 9.27. Vejiga natatoria primordial (Estadio 1). Se observa una pequeña cámara de gas que comunica con el intestino medio (▶).

Figura 9.28. Vejiga natatoria (Estadio 2). Se observa el pequeño lumen de la cámara de gas (▶), las células de la glándula de gas (★) y el conducto neumático (➡).

Figura 9.29. Vejiga natatoria (Estadio 3). Se observa la rete mirabile (●) en la zona ventro-caudal. Las células de la glándula de gas (★) y la cámara de gas (▶) han aumentado su tamaño.

Figura 9.30. Vejiga natatoria (Subestadio 4c). No se observa la cámara de gas y la vejiga ha empezado a involucionar.

Figura 9.31. Vejiga natatoria (Estadio 5). Se observan las estructuras colapsadas y claramente degeneradas.

Figura 9.32. Sistema nervioso central (Estadio 3). Se observa la disposición del telencéfalo (T), del mesencéfalo (M), del diencéfalo (D), del mielencéfalo (MI), del cerebelo (C) y de la glándula pineal (★). En el estrato medio (▶) los neuroblastos se encuentran más compactados que en el estrato interno (➡).



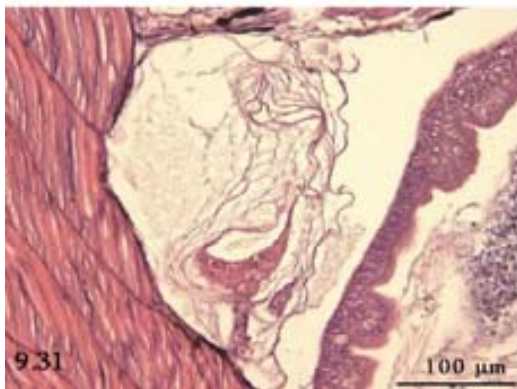
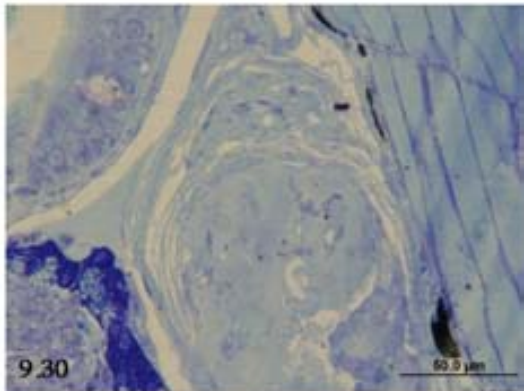
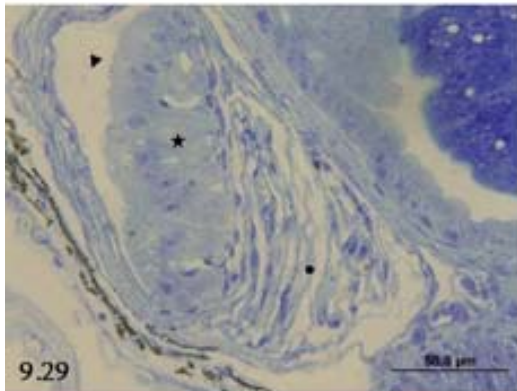
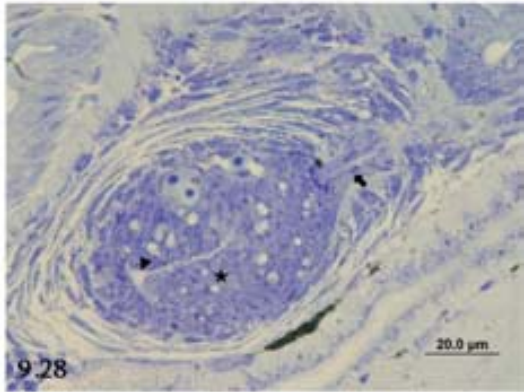
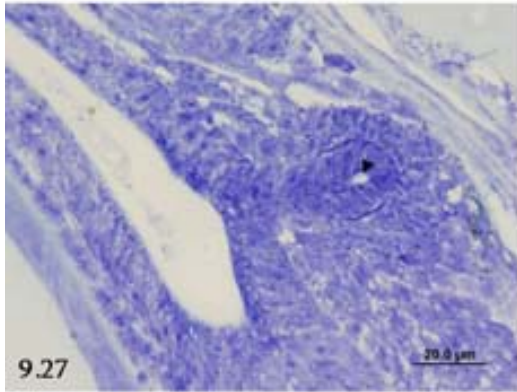
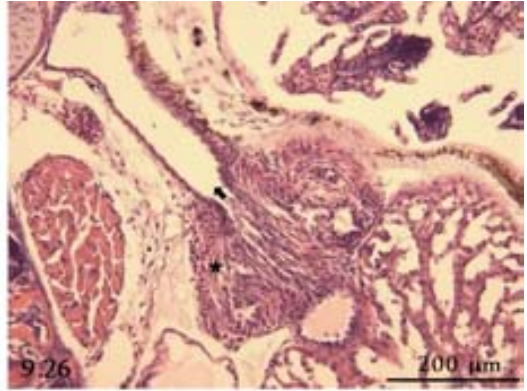
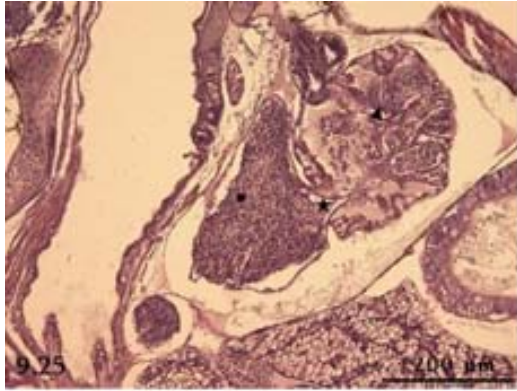


Figura 9.33. Detalle del cerebelo (Estadio 3). Se distingue la zona de materia blanca (★) y la zona de materia gris (●), donde se aprecia el estrato externo (▶), el estrato medio (➡) y el estrato interno (↔). En la zona exterior se diferencia la acumulación de melanina en las células de las meninges (☛).

Figura 9.34. Hipotálamo ( ↔ ) (Subestadio 4a) localizado en la zona ventral del diencefalo. Se observa el seno infundibular (▶) y el saccus vasculosus (➡).

Figura 9.35. Detalle de las primeras neuronas maduras (➡) (Subestadio 4b) que aparecen en la zona límite entre la materia blanca (★) y la materia gris (●).

Figura 9.36. Invaginación de una de las placas olfativas (Estadio 3) para formar la cápsula nasal. Se diferencian las células sensoriales (★) y los cilios (➡).

Figura 9.37. Concentración de neuromastos (➡) en la zona cefálica (Estadio 3). Se observa la acumulación de células cloruro (▶) en esta región.

Figura 9.38. Aspecto general de los estratos del ojo (Estadio 1), fibroblastos (F), epitelio pigmentario (EP), capa nuclear externa (NE), capa plexiforme externa (PE), capa nuclear interna (NI), capa plexiforme interna (PI), capa ganglionar (G), cristalino (CR) y córnea (C).

Figura 9.39. Detalle de la acumulación de melanina en el epitelio pigmentario (➡) (Estadio 3), de la disminución de la densidad celular en la capa nuclear interna (★) y de la aparición de fibras nerviosas en las capas plexiforme interna y ganglionar (▶). También se puede observar el proceso falciforme (PF).

Figura 9.40. Aspecto general del ojo (Subestadio 4a) en el que se observa la coroides en contacto con el cristalino (CO) y algunos condroblastos (➡) entre la capa de epitelio y de fibroblastos.

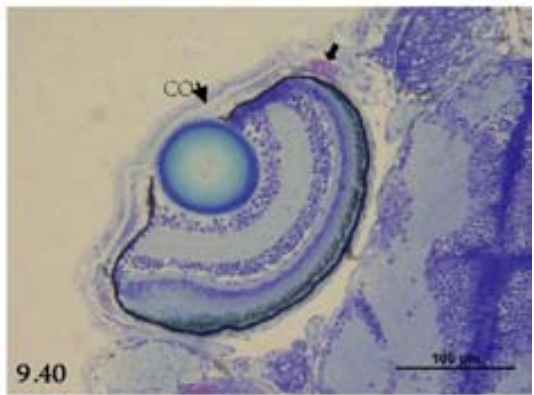
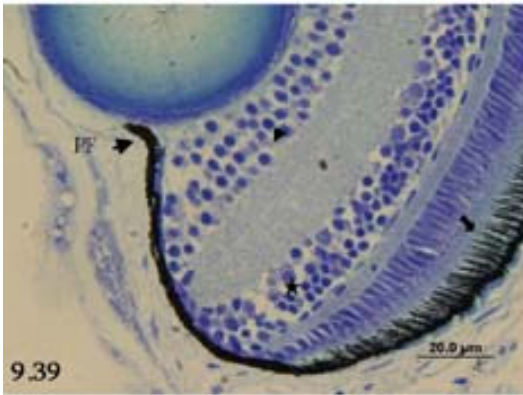
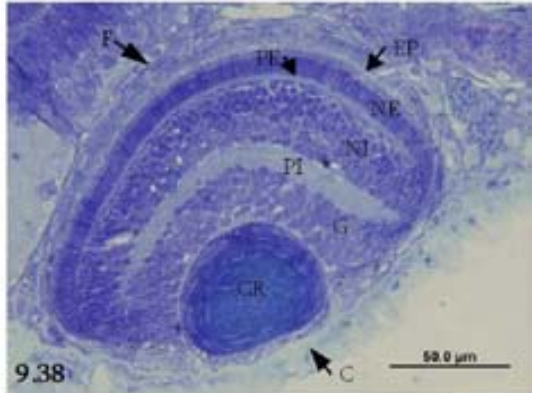
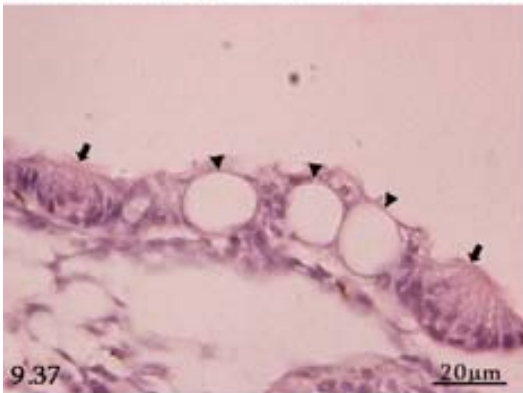
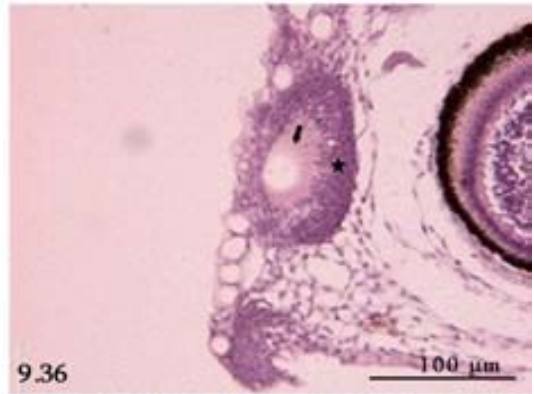
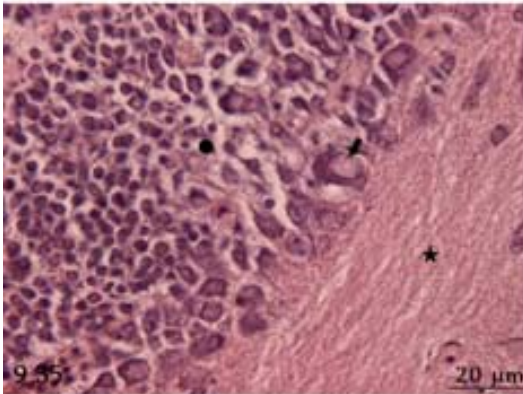
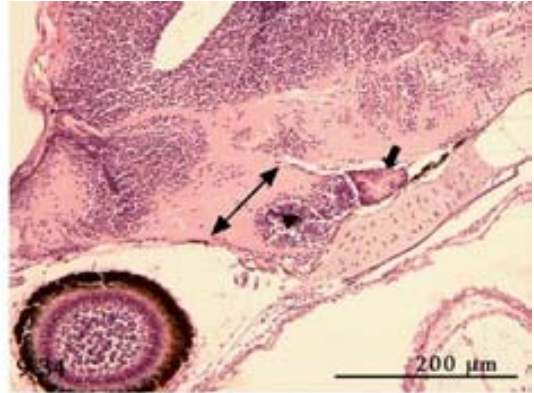
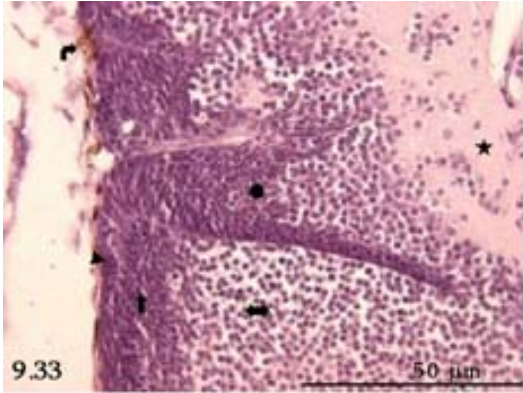
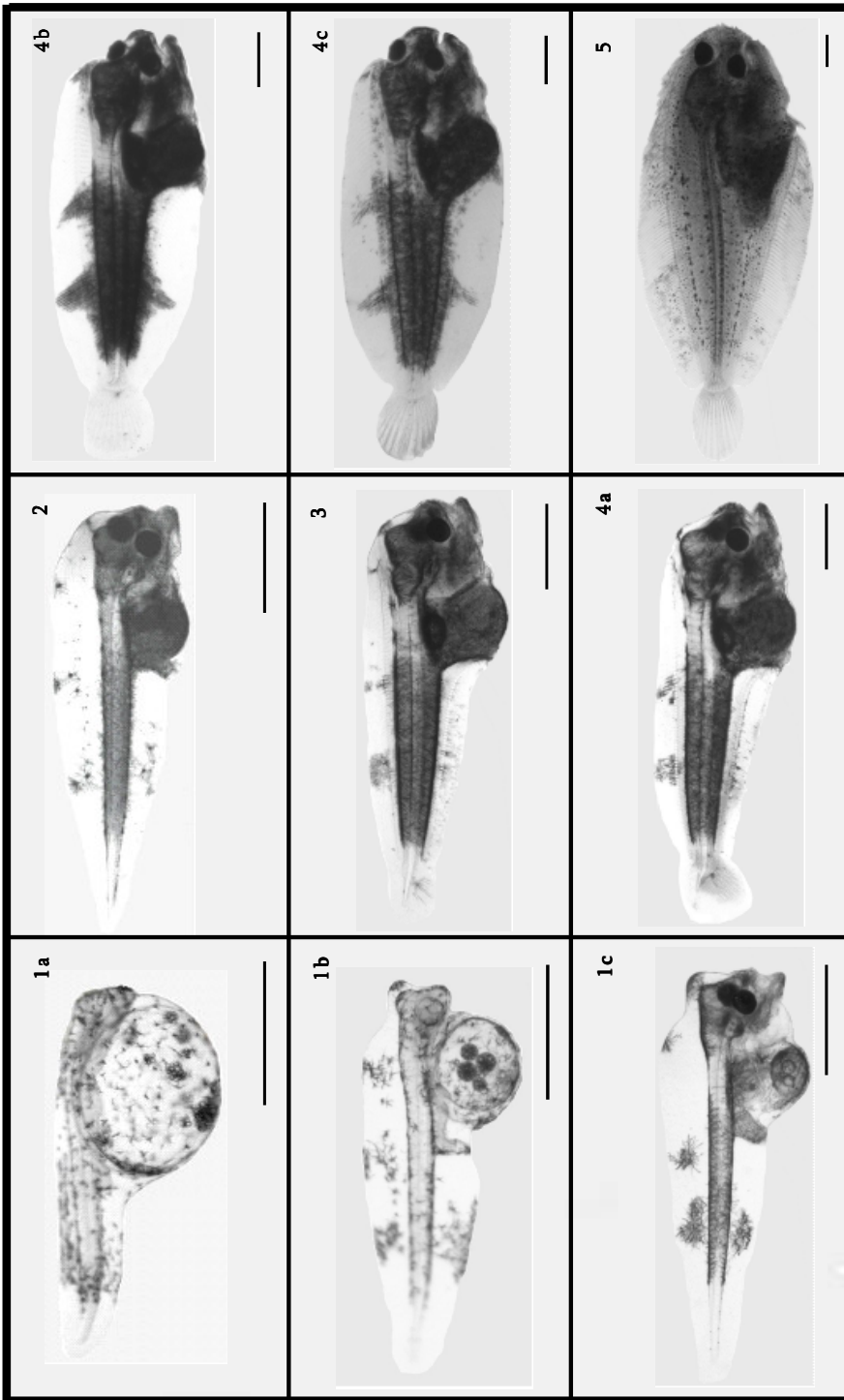


Figura 9.41. Se muestran las principales características morfológicas externas dentro de cada uno de los estadios y subestadios de desarrollo. La línea indica una distancia de 1 mm.





## *10. CONCLUSIONES*





1. En el momento de la apertura de la boca, las larvas de lenguado senegalés son capaces de capturar e ingerir nauplios de *Artemia* enriquecidos.
2. Una alimentación subóptima de las larvas provoca retrasos en la migración del ojo y en la metamorfosis, en los estudios comparativos se hace necesario relacionar estos procesos con la talla del pez y no con la edad.
3. El contenido de ARA en la dieta no afecta ni al crecimiento ni a la supervivencia pero si afecta a la metamorfosis, provocando un retraso en el proceso cuando se suministra un exceso de este ácido graso.
4. Al aumentar la cantidad de ARA en los tejidos la cantidad de EPA disminuye debido a una relación de competencia entre ambos ácidos grasos.
5. Existe una clara relación entre el contenido de ARA en la dieta, la acumulación de ARA en los tejidos y el grado de pigmentación de las larvas del lenguado senegalés. A mayor contenido de ARA en la dieta, mayor es la proporción de individuos despigmentados. Las relaciones del ARA con otros ácidos grasos (ARA/EPA, ARA/DHA) muestran la misma tendencia.
6. Las larvas del lenguado senegalés tienen nulos o muy bajos requerimientos nutricionales de DHA.
7. Existe una relación positiva entre el contenido de EPA en la dieta, la acumulación de EPA en los tejidos y el grado de pigmentación de las larvas del lenguado senegalés. Si no se proporciona una cantidad de EPA adecuada en la dieta de las larvas, estas desarrollaran anomalías pigmentarias, aunque su crecimiento no se verá afectado.

8. La composición en ácidos grasos de los nauplios de *Artemia* enriquecidos no se ve afectada por el proceso de congelación.
9. Existe una correlación positiva entre el contenido en ARA de los tejidos y los niveles de prostaglandinas producidas, lo que conlleva una correlación negativa entre la producción de prostaglandinas y el grado de pigmentación de las larvas del lenguado senegalés.
10. La larva del lenguado senegalés consume rápidamente sus reservas endógenas de vitelo, lo que le permite un rápido desarrollo de los sentidos y por lo tanto una elevada capacidad para detectar a las presas, en consecuencia, su alimentación exógena se inicia tempranamente en el desarrollo.
11. La rápida iniciación de la alimentación exógena acelera al máximo el crecimiento de la larva del lenguado senegalés, lo que conlleva un adelanto de la metamorfosis y un inicio del comportamiento bentónico muy pronto en el desarrollo, de este modo su vulnerabilidad frente a los depredadores se reduce.
12. La larva del lenguado senegalés sigue unos patrones de desarrollo similares al de otras larvas de peces planos, no obstante se aprecian características específicas en el desarrollo de la piel y de las funciones gustativas, lo que parece indicar que al final de la migración del ojo la metamorfosis no está completa.

## *11. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS*



- Abellan, E., Basurco, B., 1999. Marine Finfish Species Diversification: Current Situation and Prospects in Mediterranean Aquaculture. Cah. Options Méditerr. Zaragoza, Spain, 139 pp.
- Able, K.W., Lamonaca, J.C., 2006. Scale formation in selected western North Atlantic flatfishes. J. Fish Biol. 68, 1679-1692.
- Alderson, R., Howell, B.R., 1973. The effect of algae on the water conditions in fish tanks in relation to the growth of juvenile sole, *Solea solea* (L.). Aquaculture 19, 281-288.
- Al-Maghazachi, S.J., Gibson, R., 1984. The developmental stages of larval turbot, *Scophthalmus maximus* (L.). J. Exp. Marin. Biol. Ecol. 82, 35-51.
- Amara, R., Lagardère, F., 1995. Taille et âge au debut de la métamorphose chez la sole (*Solea solea* (L.)) du golfe de Gascogne. ICES J. Mar. Sci. 52, 247-256.
- Ando, H., Ryu, A., Hashimoto, A., Oka, M., Ichibashi, M., 1998. Linoleic acid and alpha-linolenic acid lightens ultraviolet-induced hyperpigmentation of the skin. Arch. Dermatol. Res. 290, 375-381.
- Ando, H., Funasaka, Y., Oka, M., Oaci, A., Furumura, M., Matsunaga, J., Matsunaga, N., Hearing, V.J., Ichibashi, M., 1999. Possible involvement of proteolytic degradation of tyrosinase in the regulatory effect of fatty acids on melanogenesis. J. Lipid Res. 40, 1312-1316.
- Ando, H., Watabe, H., Valencia, J.C., Yasumoto, K., Furumura, M., Funasaka, Y., Oka, M., Ichibashi, M., Hearing, V.J., 2004. Fatty acids regulate pigmentation via proteasomal degradation of tyrosinase – a new aspect of ubiquitin-proteasome function. J. Biol. Chem. 279, 15427-15433.
- Anguis, V., Cañavate, J.P., 2005. Spawning of captive Senegal sole (*Solea senegalensis*) under a naturally fluctuating temperature regime. Aquaculture 243, 133-145.
- APROMAR, 2006. Asociación Empresarial de Productores de Cultivos Marinos. (<http://www.apromar.es/infromes.asp>).

- Aragao, C., 1999. The effect of feeding rotifers at first feeding of *Solea senegalensis*. Working report, CCMAR, Universidade do Algarve, 4 pp.
- Aragao, C., Conceição, L.E.C., Martins, D., Ronnestad, I., Gomes, E., Dinis, M.T., 2004. A balanced dietary amino acid profile improves amino acid retention in post-larval Senegalese sole (*Solea senegalensis*). *Aquaculture* 233, 293-304.
- Arellano, J.M., Dinis, M.T., Sarasquete, C., 1999. Histomorphological and histochemical characteristics of the intestine of the Senegal sole, *Solea senegalensis*. *Europ. J. Histochem.* 43, 121-133.
- Arellano, J.M., Storch, V., Sarasquete, C., 2001a. Histological and histochemical observations in the stomach of the Senegal sole, *Solea senegalensis*. *Histol. Histopathol.* 16, 511-521.
- Arellano, J.M., Storch, V., Sarasquete, C., 2001b. An histological and histochemical study of the oesophagus and oesogaster of the Senegal sole, *Solea senegalensis*. *Europ. J. Histochem.* 45, 279-294.
- Arellano, J.M., Storch, V., Sarasquete, C., 2002. Ultrastructural study on the intestine of Senegal sole, *Solea senegalensis*. *J. Appl. Ichthyol.* 18, 154-158.
- Arends, R.J., Mancera, J.M., Muñoz, J.L., Wendelaar Bonga, S.E., Flik, G., 1999. The stress response of the gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.) to air exposure and confinement. *J. Endocrinol.* 163, 149-157.
- Baglole, C.J., Murray, H.M., Goft, G.P., Wright, G.M., 1997. Ontogeny of the digestive tract during larval development of yellowtail flounder: a light microscopic and mucous histochemical study. *J. Fish Biol.* 51, 120-134.
- Batty, R., Hoyt, R.D., 1995. The role of sense organs in the feeding behaviour of juvenile sole and plaice. *J. Fish Biol.* 47, 931-939.
- Bayarri, M.J., Muñoz-Cueto, J.A., López-Olmeda, J.F., Vera, L.M., Rol de Lama, M.A., Madrid, J.A., Sanchez-Vazquez, F.J., 2004. Daily locomotor activity and melatonin rhythms in Senegal sole (*Solea senegalensis*). *Physiol. Behaviour* 81, 577-583.

- Bedoui, R., 1995. Elevage de *Solea senegalensis* (Kaup, 1958) en Tunisia. Cah. Options Méditerran. 16, 31-39.
- Bell, J.G., Youngson, A., Mitchell, A.I., Cowey, C.B., 1989. The effect of enhanced intake of linoleic acid on the fatty acid composition of tissue polar lipids of post smolt Atlantic salmon (*Salmo salar*). Lipids 24, 240-242.
- Bell, J.G., Tocher, D.R., Sargent, J.R., 1994. Effects of supplementation with 20:3(n-6), 20:4(n-6) and 20:5(n-3) on the production of prostaglandins E and F of the 1-, 2-, and 3-series in turbot (*Scophthalmus maximus*) brain astroglial cells in primary culture. Biochem. Biophys. Acta 1211, 335-342.
- Bell, J.G., Castell, J.D., Tocher, D.R., MacDonald, F.M., Sargent, J.R., 1995a. Effects of different dietary arachidonic acid – docosahexaenoic acid ratios on phospholipids fatty acid compositions and prostaglandin production in juvenile turbot (*Scophthalmus maximus*). Fish Physiol. Biochem. 14, 139-151.
- Bell, J.G., McEvoy, L.A., Estévez, A., Shields, R.J., Sargent, J.R., 2003. Optimising lipid nutrition in first-feeding flatfish larvae. Aquaculture 227, 211-220.
- Bell, J.G., Strachan, F., Good, J.E., Tocher, D.R., 2006. Effect of dietary echium oil on growth, fatty acid composition and metabolism, gill prostaglandin production and macrophage activity in Atlantic cod (*Gadus morhua*). Aquac. Res. 37, 606-617.
- Bell, M.V., Henderson, R.J., Pirie, B.J.S., Sargent, J.R., 1985. Effects of dietary polyunsaturated fatty acids deficiencies on mortality, growth and gill structure in the turbot, *Scophthalmus maximus*. J. Fish Biol. 26, 181-191.
- Bell, M.V., Dick, J.R., 1991a. Molecular species composition of phosphatidylinositol from the brain, retina, liver and muscle of cod (*Gadus morhua*). Lipids 25, 691-694.
- Bell, M.V., Dick, J.R., 1991b. Molecular species composition of the major diacyl glycerophospholipids from the muscle, liver, retina and brain of cod (*Gadus morhua*). Lipids 26, 565-573.

- Bell, M.V., Batty, R.S., Dick, J.R., Fretwell, K., Navarro, J.C., Sargent, J.R., 1995b. Dietary deficiency of docosahexaenoic acid impairs vision at low light intensities in juvenile herring (*Clupea harengus* L.). *Lipids* 30, 443-449.
- Ben-Tuvia, A., 1990. A taxonomic reappraisal of the Atlanto-Mediterranean soles *Solea solea*, *S. senegalensis* and *S. lascaris*. *J. Fish Biol.* 36, 947-960.
- Bengtson, D.A., 1999. Aquaculture of summer flounder (*Paralichthys dentatus*): status of knowledge, current research and future priorities. *Aquaculture* 176, 39-49.
- Bessonart, M., Izquierdo, M.S., Salhi, M., Hernández-Cruz, C.M., González, M.M., Fernández-Palacios, H., 1999. Effect of dietary arachidonic acid levels on growth and survival of gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.) larvae. *Aquaculture* 179, 265-275.
- Bisbal, G.A., Bengtson, D.A., 1995. Development of the digestive tract in larval summer flounder. *J. Fish Biol.* 47, 277-291.
- Blaxter, J.H.S., 1986. Development of sense organs and behaviour in teleost larvae with special reference to feeding and predator avoidance. *Trans. American Fish. Soc.* 115, 98-114.
- Blaxter, J.H.S., 1988. Pattern and variety in development. En: Hoar, W.S., Randall, D.J. (Eds.), *Fish Physiology*. Vol. XI, *The Physiology of Developing Fish, Part A: Eggs and Larvae*. London: Academic Press, pp. 1-58.
- Blaxter, J.H.S., Danielssen, D., Moksness, E., Oiestad, V., 1983. Description of the Early development of the Halibut *Hippoglossus hippoglossus* and Attempts to Rear the Larvae past First Feeding. *Mar. Biol.* 73, 99-107.
- Bolker, J.A., Hill, C.R., 2000. Pigmentation development in hatchery-reared flatfishes. *J. Fish Biol.* 56, 1029-1052.
- Boulhic, M., Gabaudan, J., 1992. Histological study of the organogenesis of the digestive system and the swim bladder of the Dover sole, *Solea solea* (Linnaeus 1758). *Aquaculture* 102, 373-396.



- Brandsen, M.P., Dunstan, G.A., Battaglène, S.C., Cobcroft, J.M., Morehead, D.T., Kolkovski, S., Nichols, P.D., 2004. Influences of Dietary n-3 Long-Chain PUFA on Body Concentrations of 20:5n-3, 22:5n-3, and 22:6n-3 in the Larvae of a Marine Teleost Fish from Australian Waters, the Striped Trumpeter (*Latris lineata*). *Lipids* 39, 215-222.
- Brandsen, M.P., Battaglène, S.C., Cobcroft, J.M., Dunstan, G.A., Morehead, D.T., Nichols, P.D., Bell, J.G., 2005a. Investigating the fatty acid requirements of larval striped trumpeter (*Latris lineata*) during the live feeding period and using dose-response techniques. En: Hendry, C.I., Van Stappen, G., Wille, M., Sorgeloos, P. (Eds.), Larvi '05. Fish and Shellfish Larviculture Symposium. Special Publication no. 36, European Aquaculture Society, Ghent, pp. 54-55.
- Brandsen, M.P., Battaglène, S.C., Morehead, D.T., Dunstan, G.A., Nichols, P.D., 2005b. Effect of dietary 22:6n-3 on growth, survival and tissue fatty acid profile of striped trumpeter (*Latris lineata*) larvae fed enriched *Artemia*. *Aquaculture* 243, 331-344.
- Brandsen, M.P., Butterfield, G.M., Walden, G.M., McEvoy, L.A., Bell, J.G., 2005c. Tank colour and dietary arachidonic acid affects pigmentation, eicosanoid production and tissue fatty acid profile of larval Atlantic cod (*Gadus morhua*). *Aquaculture* 250, 328-340.
- Brandsen, M.P., Cobcroft, J.M., Battaglène, S.C., Dunstan, G.A., Nichols, P.D., Bell, J.G., 2005d. Dietary arachidonic acid alters tissue fatty acid profile, whole body eicosanoid production and resistance to hypersaline challenge in larvae of the temperate marine fish, striped trumpeter (*Latris lineata*). *Fish Physiol. Biochem.* 30, 241-256.
- Brandsen, M.P., Cobcroft, J.M., Battaglène, S.C., Morehead, D.T., Dunstan, G.A., Nichols, P.D., Kolkovski, S., 2005e. Dietary 22:6n-3 alters gut and liver structure and behaviour in larval striped trumpeter (*Latris lineata*). *Aquaculture* 248, 275-285.

- Bromley, P.J., 1971. Relationships between the wet weight condition factor and nitrogen energy content in the common sole (*Solea solea* L.). J. Cons. Int. Explor. Mer. 34, 131-134.
- Bromley, P.J., 1977. Methods of weaning juvenile hatchery reared sole (*Solea solea* (L.)) from live food to prepared diets. Aquaculture 12, 337-347.
- Burton, D., O'Driscoll, M.P., 1992. Facilitation of melanophore responses in winter flounder (*Pseudopleuronectes americanus*). J. Exp. Biol. 168, 289-299.
- Cabral, H.N., 2000. Comparative feeding ecology of sympatric *Solea solea* and *S. senegalensis*, within the nursery areas of the Tagus estuary, Portugal. J. Fish Biol. 57, 1550-1562.
- Campinho, M.A., Silva, N., Sweeney, G.E., Power, D.M., 2006. Molecular, cellular and histological changes in skin from larval to an adult phenotype during bony fish metamorphosis. Cell Tissue Res. 327, 267-284.
- Cañavate, J.P., 2005. Opciones del lenguado senegalés (*Solea senegalensis*) para diversificar la acuicultura marina. Resúmenes del X Congreso Nacional de Acuicultura. UPV, 340-347 pp.
- Cañavate, J.P., Fernández-Díaz, C., 1999. Influence of co-feeding larvae with live and inert diets on weaning the sole *Solea senegalensis* onto commercial dry feeds. Aquaculture 174, 255-263.
- Cañavate, J.P., Zerolo, R., Fernández-Díaz, C., 2006. Feeding and development of Senegal sole (*Solea senegalensis*) larvae reared in different photoperiods. Aquaculture 258, 368-377.
- Carbó, R., Estévez, A., Furones, M.D., 2003. Intelligent and multifunctional recirculation system. Its application in research at CA-IRTA. Spec. Publ.-EAS 32, 171-172.
- Castell, J.D., Bell, J.G., Tocher, D.R., Sargent, J.R., 1994. Effects of purified diets containing different combinations of arachidonic and docosahexaenoic acid on

- survival, growth and fatty acid composition of juvenile turbot (*Scophthalmus maximus*). *Aquaculture* 128, 315-333.
- Chambers, R.C., Leggett, W.C., 1987. Size and age at metamorphosis in marine fishes: an analysis of laboratory-reared winter flounder (*Pseudopleuronectes americanus*) with a review of variation in other species. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 44, 1936-1947.
- Chantanachookhin, C., Seikai, T., Tanaka, M., 1991. Comparative study of the ontogeny of the lymphoid organs in three species of marine fish. *Aquaculture* 99, 143-155.
- Christensen, M.N., Korsgaard, B., 1999. Protein metabolism of plaice (*Pleuronectes platessa*) larvae. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 237, 225-241.
- Christie, W.W., 1982. *Lipid Analysis*. Pergamon, Oxford, UK. 207 pp.
- CIESM, 2002. The Mediterranean Science Commission. Comunicación Internet (<http://www.ciesm.org/atlas/soleasenegalensis/html>)
- Cleland, L.G., Gibson, R.A., Pedler, J., James, M.J., 2005. Paradoxical effect of n-3 containing vegetable oils on long-chain n-3 fatty acids in rat heart. *Lipids* 40, 995-998.
- Copeman, L.A., Parrish, C.C., Brown, J.A., Harel, M., 2002. Effects of docosahexaenoic, eicosapentaenoic, and arachidonic acids on the early growth, survival, lipid composition and pigmentation of yellowtail flounder (*Limanda ferruginea*): a live food enrichment experiment. *Aquaculture* 210, 285-304.
- Copeman, L.A., Parrish, C.C., 2003. Marine lipids in a cold coastal ecosystem: Gilbert Bay, Labrador. *Mar. Biol.* 143, 1213-1227.
- Coupland, K., Heberd, A., 2002. Stearidonic acid containing plant-seed oils: their potential for use in healthy foods. 93<sup>rd</sup> AOCS Annual Meeting and Expo. 5-8 May, Montreal, Canada.
- Cousin, J.C.B., Baudin-Laurencin, F., 1985. Morphogenese de l'appareil digestif et de la vessie gazeuse du turbot, *Scophthalmus maximus* L. *Aquaculture* 47, 305-319.

- Cousin, J.C.B., 1987. Histological alterations observed in turbot, *Scophthalmus maximus* L., from days 15 to 40 after hatching. *Aquaculture* 67, 218-220.
- Cowey, C.B., Adron, J.W., Owen, J.M., Roberts, R.J., 1976. The effect of different dietary oils on tissue fatty acid composition and tissue pathology in turbot (*Scophthalmus maximus*). *Comp. Biochem. Physiol.* 53B, 399-403.
- Cunha, M., Rodrigues, P., Soares, F., Makridis, P., Skjermo, J., Dinis, M.T., 2003. Development of the immune system and use of immunostimulants in Senegalese sole (*Solea senegalensis*). En: Browman, H.I., Skiftesvik, A.B. (Eds.), *The Big Fish Bang Proceedings of the 26<sup>th</sup> Annual Larval Fish Conference*. Institute of Marine Research, Bergen, pp. 189-192.
- Cunningham, J.T., 1890. A treatise on the common sole (*Solea vulgaris*) considered both as an organism and as a commodity. *J. Mar. Bio. Ass. Plymouth, U.K.*, 147 pp.
- Day, O.J., Howell, B.R., Aksnes, A., Nygard, E., 1999. A new weaning diet for *Solea* spp. *Spec. Publ. EAS* 27, 40-41.
- Dedi, J., Takeuchi, T., Seikai, T., Watanabe, T., 1995. Hypervitaminosis and safe levels of vitamin A for larval flounder (*Paralichthys olivaceus*) fed *Artemia* nauplii. *Aquaculture* 133, 135-146.
- Devresse, B., Leger, P., Sorgeloos, P., Murata, O., Nasu, T., Ikeda, S., Rainuzzo, J., Reitan, K., Kjorsvik, E., Olsen, Y., 1994. Improvement of flatfish pigmentation through the use of DHA-enriched rotifers and *Artemia*. *Aquaculture* 124, 287-288.
- Dhert, P., Lavens, P., Duray, M., Sorgeloos, P., 1990. Improved larval survival at metamorphosis of Asian seabass (*Lates calcarifer*) using omega 3-HUFA-enriched live prey. *Aquaculture* 90, 63-74.
- Diaz, J.P., Guyot, E., Mani-Ponset, L., Connes, R., 2002. Insulin and hepatic cholestasis during the early post-embryonic development of gilt-head sea bream, *Sparus aurata*. *Aquat. Living Resour.* 15, 283-292.

- Dickey-Collas, M., Geffen, A.J., 1992. Importance of the fatty acids 20:5 $\omega$ 3 and 22:6 $\omega$ 3 in the diet of plaice (*Pleuronectes platessa*) larvae. Mar. Biol. 113, 463-468.
- Dinis, M.T., 1992. Aspects of the potential of *Solea senegalensis* Kaup for aquaculture: Larval rearing and weaning to an artificial diet. Aquac. Fish. Manag. 23, 515-520.
- Dinis, M.T., Reis, J., 1995. Culture of *Solea* spp. Marine Aquaculture Finfish Species Diversification. En: Proceedings of the Seminar of the CIHEAM Network on Tecnology of Aquaculture. Cah. Options Méditerran. 16, 1-7.
- Dinis, M.T., Metailler, R., Rodeia, J., 1987. Weaning of *Solea senegalensis* Kaup 1858 with rehydratable pellets. Nato workshop on Nutrition, INIP Publ. 12, 139-147.
- Dinis, M.T., Ribeiro, L., Soares, F., Sarasquete, C., 1999. A review on the cultivation potential of *Solea senegalensis* in Spain and in Portugal. Aquaculture 176, 27-38.
- Dinis, M.T., Ribeiro, L., Conceição, L.E.C., Aragao, C., 2000. Larvae digestion and new weaning experiments in *Solea senegalensis*. Cah. Options Méditerran. 47, 193-204.
- Divanach, P., 2003. New species in Mediterranean. Dream or reality? Workshop PROFET Programme, 30<sup>th</sup> May. Athens, Greece.
- Doi, M., Kohno, H., Taki, Y., Ohno, A., Singhagraiwan, T., 1994. Morphological development of eggs, larvae and juveniles of the red snapper, *Lutjanus argentimaculatus* (Pisces: Lutjanidae). J. Tokyo Univ. Fish. 81, 135-153.
- Drake, P., Arias, A.M., 1993. Larval feeding habits and diel rhythms of four species of marine fish in tidal creek of Cádiz Bay (Spain). En: Walther, B.T., Fynh, H.J., (Eds.), Physiological and Biochemical Aspects of Fish Development. Univ. Bergen, Norway, pp. 153-159.
- Drake, P., Arias, A.M., Rodriguez, R.B., 1984. Cultivo extensivo de peces marinos en los esteros de las salinas de San Fernando (Cádiz): II. Características de la producción de peces. Inf. Técn. Inst. Inv. Pesq. 116: 1-23.

- Dunstan, G.A., Nichols, P.D., Brown, M.R., 2003. Methods for preparation of oil emulsions used for live feed enrichment. CSIRO Internal Report 2003-CMR/EM1., pp.9., Hobart, Australia.
- Engrola, S., Conceição, L.E.C., Dinis, M.T., 2001. Effect of preweaning feeding regime on weaning success of *Solea senegalensis*. EAS Spec. Publ. 30, 178-181.
- Estévez, A., Kanazawa, A., 1995. Effect of (n-3) PUFA and vitamin A *Artemia* enrichment on pigmentation success of turbot *Scophthalmus maximus* (L.). Aquac. Nutr. 1, 159-168.
- Estévez, A., McEvoy, L.A., Bell, J.G., Sargent, J.R., 1999. Growth, survival, lipid composition and pigmentation of turbot (*Scophthalmus maximus*) larvae fed live-prey enriched in arachidonic and eicosapentaenoic acids. Aquaculture 180, 321-343.
- Estévez, A., Kaneko, T., Seikai, T., Dores, R.M., Tagawa, M., Tanaka, M., 2001. Ontogeny of ACTH and MSH cells in Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) in relation to albinism. Aquaculture 202, 131-143.
- Evans, D.H., Piermarini, P.M., Potts, W.T.W., 1999. Ionic transport in the fish gill epithelium. J. Exp. Zool. 283, 641-652.
- Evans, D. H., 2002. Cell signalling and ion transport across the fish gill epithelium. J. Exp. Zool. 293, 336 -347.
- Fabre-Domergue, P., Bietrix, E., 1905. Développement de la sole (*Solea vulgaris*). Introduction à l'étude de la pisciculture marine. Travail de laboratoire de zoologie maritime de Concarneau. Vuibert et Nony éd. Paris, 243 pp.
- Falk-Petersen, I.B., 2005. Comparative organ differentiation during early life stages of marine fish. Fish Shellfish Immunol. 19, 397-412.
- Falk-Petersen, I.B., Hansen, T.K., 2001. Organ differentiation in newly hatched common wolfish. J. Fish Biol. 59, 1465-1482.

- Fehri-Bedoui, R., Dinis, M.T., Maamouri, F., 2000. Histological study of the development of the digestive system and of the swim bladder in the sole, *Solea senegalensis* (Soleidae). *Cybium Paris* 24, 343-358.
- Fernández-Díaz, C., Yúfera, M., Cañavate, J.P., Moyano, F.J., Alarcón, F.J., Díaz, M., 2001. Growth and physiological changes during metamorphosis of Senegal sole reared in the laboratory. *J. Fish Biol.* 58, 1086-1097.
- Finger, T.E., 1987. Gustatory nuclei and pathways in the central nervous system. En: Finger, T.E., Silver, W.L. (Eds.), *Neurobiology of Taste and Smell*. J. Willey, NY, pp. 331-354.
- Finger, T.E., 1988. Organization of chemosensory systems within the brains of bony fish. En: Atema, J., Fay, R.R., Popper, A.N., Tavolga, W.N. (Eds.), *Sensory Biology of Aquatic Animals*. Springer-Verlag, NY, pp. 339-364.
- Finn, R.N., Ostby, G.C., Norberg, B., Fhyn, H.J., 2002. In vivo oocyte hydration in Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*); proteolytic liberation of free amino acids, and ion transport, are driving forces for osmotic water influx. *J. Exp. Biol.* 205, 211-224.
- Fishbase, 2007. Comunicación Internet  
(<http://www.fishbase.org/summary/SpeciesSummary.php?id=8852>).
- Fluchter, J., 1973. Laboratory rearing of common sole (*Solea solea* L.) under controlled conditions at high density with low mortality. *Proceedings of an International Symposium on the Early Life History of Fish held at the Dunstaffnage Marine Research Laboratory, Oban, Scotland*, pp. 725-730.
- Folch, J., Lees, N., Sloane-Stanley, G.H., 1957. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J. Biol. Chem.* 226, 497-509.
- Fonds, M., 1979. Laboratory observations on the influence of temperature and salinity on development of the eggs and growth of the larvae of *Solea solea* (Pisces). *Mar. Ecol.* 1, 91-99.

- Fuchs, J., 1978. Effect of photoperiod on growth and survival during rearing of larvae and juveniles of sole (*Solea solea* L.). *Aquaculture* 15, 63-74.
- Fuiman, L.A., Higgs, D.M., Poling, K.R., 2004. Changing Structure and Function of the Ear and Lateral Line System of Fishes during Development. *American Fish. Soc. Symp.* 40, 117-144.
- Fukuhara, O., 1986. Morphological and functional development of Japanese Flounder in early life stage. *Bull. Japan. Soc. Sci. Fish.* 52, 81-91.
- Fukuhara, O., 1988. Morphological and functional development of larval and juvenile *Limanda yokohamae* (Pisces: Pleuronectidae) reared in the laboratory. *Mar. Biol.* 99, 271-281.
- Furuita, H., Takeuchi, T., Uematsu, K., 1998. Effects of eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids on growth, survival and brain development of larval Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*). *Aquaculture* 161, 269-279.
- Gara, B., Shields, R.J., McEvoy, L., 1998. Feeding strategies to achieve correct metamorphosis of Atlantic halibut, *Hippoglossus hippoglossus* L., using enriched *Artemia*. *Aquac. Res.* 29, 935-948.
- García-Franquesa, E., Molinero, A., Valero, J., Flos, R., 1996. Influence of sex, age and season on the feeding habits of the flat fish *Solea senegalensis*. *Environ. Biol. Fishes* 47, 289-298.
- Gavaia, P.J., 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.
- Ghioni, C., Bell, J.G., Sargent, J.R., 1996. Polyunsaturated fatty acids in neutral lipids and phospholipids of some freshwater insects. *Comp. Biochem. Physiol.* 114, 161-170.
- Ghioni, C., Porter, E.A.E., Taylor, G.W., Tocher, D.R., 2002. Metabolism of 18:4n-3 (stearidonic acid) and 20:4n-3 in salmonid cells in culture and inhibition of the



- production of prostaglandin  $F_{2\alpha}$  ( $PGF_{2\alpha}$ ) from 20:4n-6 (arachidonic acid). *Fish Physiol. Biochem.* 27, 81-96.
- Gisbert, E., Piedrahita, R.H., Conklin, D.E., 2004. Ontogenetic development of the digestive system in California halibut (*Paralichthys californicus*) with notes on feeding practices. *Aquaculture* 232, 455-470.
- Graeve, M., Kattner, G., Piepenburg, D., 1997. Lipids in Arctic benthos: does the fatty acid and alcohol composition reflect feeding and trophic interactions? *Polar Biol.* 18, 53-61.
- Guggino, W.B., 1980a. Water balance in embryos of *Fundulus heteroclitus* and *F. bermudae* in seawater. *American J. Physiol.: Regul. Integr. Comp. Physiol.* 238, 36-41.
- Guggino, W.B., 1980b. Salt balance in embryos of *Fundulus heteroclitus* and *F. bermudae* adapted to seawater. *American J. Physiol.: Regul. Integr. Comp. Physiol.* 238, 42-49.
- Guichardant, M., Traitler, H., Spielmann, D., Sprecher, H., Finot, P.A., 1993. Stearidonic acid, an inhibitor of the 5-lipoxygenase pathway. A comparison with timnodonic acid and dihomogammalinolenic acid. *Lipids* 28, 321-324.
- Gupta, O.P., Lahlou, B., Botella, J., Porthe-Nibelle, J., 1985. In vivo and in vitro studies on the release of cortisol from interrenal tissue in trout: 1. Effect of ACTH and prostaglandins. *Exp. Biol.* 43, 201-212.
- Guyot, E., Diaz, J.P., Romestand, B., Connes, R., 1998. Insulin during the early post-embryonic development of the gilt-head sea bream *Sparus aurata*. Ultrastructural, immunocytochemical and biochemical studies. *Gen. Comp. Endocrinol.* 110, 147-156.
- Hamlin, H.J., Herbing, I.H., Kling, L.J., 2000. Histological and morphological evaluations of the digestive tract and associated organs of haddock throughout post-hatching ontogeny. *J. Fish Biol.* 57, 716-732.

- Hamre, K., Opstad, I., Espe, M., Solbakken, J., Hemre, G.I., Pittman, K., 2002. Nutrient composition and metamorphosis success of Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*, L.) larvae fed natural zooplankton or *Artemia*. *Aquac. Nutr.* 8, 139-148.
- Harel, M., Lund, E., Gavasso, S., Herbert, R., Place, A.R., 2000. Modulation of Arachidonate and Docosahexaenoate in *Morone chrysops* Larval Tissues and the Effect on Growth and Survival. *Lipids* 35, 1259-1280.
- Hiroi, J., Kaneko, T., Seikai, T., Tanaka, M., 1998. Developmental Sequence of Chloride Cells in the Body Skin and Gills of Japanese Flounder (*Paralichthys olivaceus*) Larvae. *Zool. Sci.* 15, 455-460.
- Hoehne-Reitan, K., Elin Kjorsvik, E., 2004. Functional Development of the Liver and Exocrine Pancreas in Teleost Fish. *American Fish. Soc. Symp.* 40, 9-36.
- Holland, D.L., 1978. Lipid reserves and energy metabolism in the larvae of benthic marine invertebrates. En: Malins, D.C., Sargent, J.R. (Eds.), *Biochemistry and Biophysical Perspectives in Marine Biology*, vol. 4. Academic Press, NY, pp. 85-129.
- Honma, Y., Shioda, S., Yoshie, S., 1977. Changes in the thyroid gland associated with the diadromous migration and migration of the threespine stickleback. *Jap. J. Ichthyol.* 24, 17-25.
- Hopkins, K.D., 1992. Reporting fish growth: a review of the basics. *J. World Aquac. Soc.* 23, 173-179.
- Horia, E., Watkins, B.A., 2005. Comparison of stearidonic acid and  $\alpha$ -linolenic acid on PGE<sub>2</sub> production and COX-2 protein levels in MDA-MB-231 breast cancer cell cultures. *J. Nutr. Biochem.* 16, 184-192.
- Houde, E.D., Schekter, R.C., 1981. Growth rates, ratios and cohort consumption of marine fish larvae in relation to prey concentrations. *Rapports du Conseil International pour la Exploration de la Mer* 178, 441-453.

- Howell, B.R., 1979. Experiments on the rearing of larval turbot, *Scophthalmus maximus* L. Aquaculture 18, 215-225.
- Howell, B.R., 1997. A re-appraisal of the potential of the sole, *Solea solea* (L.), for commercial cultivation. Aquaculture 155, 355-365.
- Howell, B.R., Bread, T.W., Hallam, J.D., 1995. The effect of diet quality on the low-temperature tolerance of juvenile sole, *Solea solea* (L.). ICES CM 1995/F, vol. 13. 9 pp.
- Hu, N., Sedmera, D., Yost, H.J., Clark, E.B., 2000. Structure and Function of the Developing Zebrafish Heart. Anat. Record 260, 148-157.
- Hutchinson, S., Hawkins, L.E., 2004. The relationship between temperature and size and age of larvae and peri-metamorphic stages of *Pleuronectes flesus*. J. Fish Biol. 65, 448-459.
- Inui, Y., Miwa, S., Yamano, K., Hirano, T., 1994. Hormonal control of flounder metamorphosis. Perspec. Comp. Endocrinol., 408-411.
- Inui, Y., Yamano, K., Miwa, S., 1995. The role of thyroid hormones in tissue development in metamorphosing flounder. Aquaculture 135, 87-98.
- Iwata, N., Kikuchi, K., 1998. Effects of sandy substrate and light on hypermelanosis of the blind side in cultured Japanese flounder *Paralichthys olivaceus*. Environ. Biol. Fishes 52, 291-297.
- Izquierdo, M.S., 1996. Essential fatty acid requirements of cultured marine fish larvae. Aquac. Nutr. 2, 183-191.
- Izquierdo, M.S., Watanabe, F., Takeuchi, T., Arakawa, T., Kitajima, C., 1989. Requirement of larval red seabream *Pagrus major* for essential fatty acids. Nipp. Suis. Gakk. 55, 859-867.
- Izquierdo, M.S., Arakawa, T., Takeuchi, T., Haroun, R., Watanabe, T., 1992. Effect of n-3 HUFA levels in *Artemia* on growth of larval Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*). Aquaculture 105, 73-82.

- Izquierdo, M.S., Socorro, J., Arantzamendi, L., Hernández-Cruz, C.M., 2000. Recent advances in lipid nutrition in fish larvae. *Fish Physiol. Biochem.* 22, 97-107.
- Izquierdo, M.S., Obach, A., Arantzamendi, L., Montero, D., Robaina, L., Rosenlund, G., 2003. Dietary lipid sources for seabream and seabass: growth performance, tissue composition and flash quality. *Aquac. Nutr.* 9, 397-407.
- JACUMAR, 2006. Junta Nacional Asesora de Cultivos Marinos. Comunicación Internet (<http://www.mapa.es/es/pesca/pags/jacumar/>)
- James, M.J., Ursin, V.M., Cleland, L.G., 2003. Metabolism of stearidonic acid in human subjects: comparison with the metabolism of other n-3 fatty acids. *Am. J. Clin. Nutr.* 77, 1140-1145.
- Jones, D.R., Randall, D.J., 1978. The respiratory and circulatory systems during exercise. En: Hoar, W.S., Randall, D.J. (Eds.), *Fish physiology*, vol. 7. Academic Press, NY, pp. 425-501.
- Jürs, K., Bastrop, R., 1995. The function of mitochondria-rich cells (chloride cells) in teleost gills. *Rev. Fish Biol. Fish.* 5, 235-255.
- Kainz, M., Arts, M.T., Mazumder, A., 2004. Essential fatty acids in the planktonic food web and their ecological role for higher trophic levels. *Limnol. Oceanogr.* 49, 1784-1793.
- Kanazawa, A., 1985. Essential fatty acid and lipid requirement of fish. En: Cowey, C.B., Mackie, A.M., Bell, J.G. (Eds.), *Nutrition and Feeding of Fish*. London: Academic Press, pp. 281-298.
- Kanazawa, A., 1993. Essential phospholipids in fish and crustaceans. En: Kaushik, S.J., Luquet, P. (Eds.), *Fish Nutrition in Practice*. Paris: INRA, pp. 519-530.
- Kanazawa, A., 1995. Nutrition of larval fish. En: Lim, C., Sessa, D. (Eds.), *Nutrition and Utilization Technology in Aquaculture*. Champaign: AOCS Press, pp. 50-59.

- Kaneko, T., Hasegawa, S., Takagi, Y., Tagawa, M., Hirano, T., 1995. hyposome regulatory ability of eyedstage embryos of chum salmon. *Mar. Biol.* 122, 165-170.
- Kates, K., Volcani, B.E., 1966. Lipid components of diatoms. *Biochem. Biophys. Acta* 116, 264-278.
- Keefe, M., Able, K.W., 1993. Patterns of metamorphosis in summer flounder, *Paralichthys dentatus*. *J. Fish Biol.* 42, 713-721.
- Kiyohara, S., Sakata, Y., Yoshitomi, T., Tsukuhara, J., 2002. The “goatee” of goatfish: innervation of taste buds in the barbels and their representations in the brain. *Proc. R. Soc. Lond.* 269, 1773-1780.
- Kotrschal, K., van Staaden, M.J., Huber, R., 1998. Fish brains: evolution and environmental relationships. *Rev. Fish Biol. Fish.* 8, 373-408.
- Koumoundouros, G., Divanach, P., Kentouri, M., 1999. Ontogeny and allometric plasticity of *Dentex dentex* (Osteichthyes: Sparidae) in rearing conditions. *Marine Biology* 135, 561-572.
- Koumoundouros, G., Kouttoui, S., Georgakopoulou, E., Papadakis, I., Maingot, E., Kaspiris, P., Kiriakou, Y., Georgiou, G., Divanach, P., Kentouri, M., Mylonas, C., 2005. Ontogeny of the shi drum *Umbria cirrosa* (Linnaeus 1758), a candidate new species for aquaculture. *Aquac. Res.* 36, 1265-1272.
- Koven, W., Barr, Y., Lutzky, S., Ben-Atia, I., Weiss, R., Harel, M., Behrens, P., Tandler, A., 2001. The effect of dietary arachidonic acid (20:4n-6) on growth, survival and resistance to handling stress in gilthead seabream (*Sparus aurata*) larvae. *Aquaculture* 193, 107-122.
- Koven, W., Van Anholt, R., Lutzky, S., Ben Atia, I., Nixon, O., Ron, B., Tandler, A., 2003. The effect of dietary arachidonic acid on growth, survival, and cortisol levels in different-age seabream larvae (*Sparus aurata*) exposed to handling or daily salinity change. *Aquaculture* 228, 369-383.

- Kvenseth, A.M., Pittman, K., Helvik, J.V., 1996. Eye development in Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*): differentiation and development of the retina from early yolk sac stages through metamorphosis. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 53, 2524-2532.
- Lagardere, F., Decamps, P.H., Quero, J.C., 1979. Découverte le long des côtes de la Charente Maritime d'une population de *Solea senegalensis* Kaup 1858 (soleidae, Pleuronectiformes). *Ann. Soc. Sci. Nat. Charente-Maritime* 6, 563-572.
- Lands, W.E.M., 1993. Eicosanoids and health. *Annals of the New York Academy of Sciences* 676, 46-59.
- Laurence, G.C., 1977. A bioenergetic model for the analysis of feeding and survival potential of winter flounder, *Pseudopleuronectes americanus*, larvae during the period from hatching to metamorphosis. *Fish. Bull.* 75, 529-546.
- Lê, K.L., 1982. Nouvelle description des larves et post-larves de la "Sole de Courreaux", *Solea senegalensis* Kaup, 1858 (Pisces, Pleuronectiformes, Soleidae) du Golfe de Gascogne. *Cybiurn* 6, 21-33.
- Le Milinaire, C., 1984. Etude du besoin en acides gras essentiels pour la larve de turbot (*Psetta maxima* L.) pendant la phase d'alimentation avec le rotifer *Brachionus plicatilis* (O.F. Muller). Tesis Doctoral, Universidad de la Breaña Occidental.
- Lee, M.H., Kim, H.J., Ha, D.J., Paik, J.H., Kim, H.Y., 2002. Therapeutic effect of topical application of linoleic acid and Lincomycin in combination with Betamethasone Valerate in melasma patients. *J. Korean Med. Sci.* 17, 518-523.
- Li, J., Eygensteyn, J., Lock, R.A.C., Verbost, P.M., van der Heijden, J.J.H., Wendelaar Bonga, S.E., Flik, G., 1995. Branchial chloride cells in larvae and juveniles of freshwater tilapia *Oreochromis mossambicus*. *J. Exp. Biol.* 198, 2177-2184.
- Lombarte, A., Aguirre, H., 1997. Quantitative differences in the chemoreceptor systems in the barbells of two species of Mullidae (*Mullus surmuletus* and *M. barbatus*) with different bottom habitats. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 150, 57-64.

- Luizi, F.S., Gara, B., Shields, R.J., Bromage, N.R., 1999. Further description of the development of the digestive organs in Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*) larvae, with notes on differential absorption of copepod and *Artemia* prey. *Aquaculture* 176, 101-116.
- Madon, S.P., 2002. Ecophysiology of juvenile California halibut *Paralichthys californicus* in relation to body size, water temperature and salinity. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 243, 235-249.
- Mangor, J.A., Harbe, T., Shields, R.J., Gara, B., Naas, K.E., 1998. Atlantic halibut, *Hippoglossus hippoglossus* L., larvae cultivation literature, including a bibliography. *Aquac. Res.* 29, 857-886.
- Marín-Magán, V., Anguís, V., Cañavate, J.P., 1995. Selective feeding and prediction of food consumption in sole larvae *Solea senegalensis* reared on rotifer *Brachionus plicatilis* and *Artemia* nauplii. *EAS Esp. Publ.* 24, 3 pp.
- Marmulla, G., Rösch, R., 1990. Maximum daily ration of juvenile fish fed on living natural zooplankton. *J. Fish Biol.* 36, 789-801.
- Martell, D.J., Kieffer, J.D., Trippel, E.A., 2006. Effects of the embryonic thermal environment on haddock (*Melanogrammus aeglefinus*) developmental trajectories through exogenous feeding stages. *Mar. Biol.* 149, 177-187.
- Martínez, G.M., Bolker, J.A., 2001. Embryonic and larval staging of summer flounder (*Paralichthys dentatus*). *J. Morphol.* 255, 162-176.
- Martínez, I., Moyano, F.J., Fernández-Díaz, C., Yúfera, M., 1999. Digestive enzyme activity during larval development of the Senegal sole (*Solea senegalensis*). *Fish Physiol. Biochem.* 21, 317-323.
- Martínez, I., Moyano, F.J., Fernández-Díaz, C., Yúfera, M., 2004. Digestive enzyme activity during larval development of the Senegal sole (*Solea senegalensis*). *Fish Physiol. Biochem.* 21, 317-323.

- Masuda, R., Ziemann, D.A., Ostrowski, A.C., 2001. Patchiness formation and development of schooling behaviour in pacific threadfin *Polydactylus sexfilis* reared with different dietary highly unsaturated fatty acid contents. J. World Aquac. Soc. 32, 309-316.
- McCormick, S. D., 1990. Cortisol directly stimulates differentiation of chloride cells in tilapia opercular membrane. Am. J. Physiol. 259, 857-864.
- McCormick, S. D., 1995. Hormonal control of gill Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase and chloride cell function. En: Wood, C.M., Shuttleworth, T.J. (Eds.), Fish physiology, vol. 14. Academic Press, NY, pp. 285-315.
- McEvoy, L.A., Estévez, A., Bell, J.G., Shields, R.J., Gara, B., Sargent, J.R., 1998a. Influence of dietary levels of eicosapentaenoic and arachidonic acids on the pigmentation success of turbot (*Scophthalmus maximus* L.) and halibut (*Hippoglossus hippoglossus* L.). Bull. Aquac. Assoc. Can. 98, 17-20.
- McEvoy, L.A., Naess, T., Bell, J.G., Lie, O., 1998b. Lipid and fatty acid composition of normal and malpigmented Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*) fed enriched *Artemia*: a comparison with fry fed wild copepods. Aquaculture 163, 237-250.
- McFarlane, G.A., Jensen, J.O.T., Andrews, W.T., Groot, E.P., 1991. Egg and yolk sac larval development of the Pacific halibut (*Hippoglossus stenolepis*). Int. Pac. Halibut Comm. Tech. Rep. 24.
- Miller, M., Carter, C., Nichols, P., 2005. Alternative sources of dietary oil for Atlantic salmon (*Salmo salar*). Asia Pac. J. Clin. Nutr. 14 (Suppl.): S61.
- Minami, T., 1982. The early life history of a flounder *Paralichthys olivaceus*. Bull. Jap. Soc. Sci. Fish. 48, 1581-1588.
- Miwa, S., Inui, Y., 1987. Effects of various doses of thyroxine and triiodothyronine on metamorphosis of flounder (*Paralichthys olivaceus*). Gen. Comp. Endocrinol. 67, 356-363.



- Miwa, S., Tagawa, M., Inui, Y., Hirano, T., 1988. Thyroxine surge in metamorphosing flounder larvae. *Gen. Comp. Endocrinol.* 70, 158–163.
- Miyazaki, T., Masuda, R., Furuta, S., Tsukamoto, K., 2000. Feeding behaviour of hatchery-reared juveniles of the Japanese flounder following a period of starvation. *Aquaculture* 190, 129-138.
- Mommsen, T.P., Plisestkaya, E.M., 1991. Insulin in fishes and Agnathans: history, structure, and metabolic regulation. *Rev. Aquat. Sci.* 4, 225-259.
- Monroig, O., 2006. Diseño y optimización de liposomas para su uso como sistema de suministro de nutrientes a larvas de peces marinos. Tesis Doctoral, Universitat de València.
- Morais, S., 2006. Dietary neutral lipid level and source in Senegalese sole (*Solea senegalensis*) larvae: Effect on growth, lipid metabolism and digestive capacity. *Comp. Biochem. Physiol.* 144, 57-69.
- Morais, S., Lacuisse, M., Conceição, L.E.C., Dinis, M.T., Ronnestad, I., 2004a. Ontogeny of the digestive capacity of Senegalese sole (*Solea senegalensis*), with respect to digestion, absorption and metabolism of amino acids from *Artemia*. *Mar. Biol.* 145, 243-250.
- Morais, S., Narciso, L., Dores, E., Pousao-Ferreira, P., 2004b. Lipid enrichment for Senegalese sole (*Solea senegalensis*) larvae: effect on larval growth, survival and fatty acid profile. *Aquac. Int.* 12, 281-298.
- Morais, S., Koven, W., Ronnestad, I., Dinis, M.T., Conceição, L.E.C., 2005. Dietary protein/lipid ratio affects growth and amino acid and fatty acid absorption and metabolism in Senegalese sole (*Solea senegalensis* Kaup 1858) larvae. *Aquaculture* 246, 347-357.
- Morehead, D.T., Battaglione, S.C., Metillo, E.B., Bransden, M.P., Dunstan, G.A., 2005. Copepods as a live feed for striped trumpeter *Latris lineata* larvae. En: Lee, C.S.,

- O'Bryen, P., Marcus, N. (Eds.), *Copepods in Aquaculture*. Blackwell Publishing, Ames, IA.
- Mourente, G., 2003. Accumulation of DHA (docosahexaenoic acid; 22:6n-3) in larval and juvenile fish brain. En: Browman, H.I., Skiftesvik, A.B. (Eds.), *The Big Fish Bang, Proceedings of the 26<sup>th</sup> Annual Larval Fish Conference*. Institute of Marine research, Bergen, Norway, pp. 239-248.
- Mourente, G., Tocher, D.R., 1994. In vivo metabolism of [1-<sup>14</sup>C] linolenic acid [18 :3n-3] and [1-<sup>14</sup>C] eicosapentaenoic acid [20:5(n-3)] in a marine fish: time course of the desaturation/elongation pathway. *Biochem. Biophys. Acta* 1212, 109-118.
- Mourente, G., Vazquez, R., 1996. Changes in the content of total lipid, lipid classes and their fatty acids of developing eggs and unfed larvae of the Senegal sole, *Solea senegalensis* Kaup. *Fish Physiol. Biochem.* 15, 221-235.
- Mourente, G., Tocher, D.R., Sargent, J.R., 1991. Specific accumulation of docosahexaenoic acid (22:6n-3) in brain lipids during development of juvenile turbot *Scophthalmus maximus* L. *Lipids* 26, 871-877.
- Mourente, G., Rodríguez, A., Tocher, D.R., Sargent, J.R., 1993. Effects of dietary docosahexaenoic acid (DHA, 22 :6n-3) on lipid and fatty acid compositions and growth in gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.) larvae during first feeding. *Aquaculture* 112, 79-98.
- Mourente, G., Rodríguez, A., Grau, A., Pastor, E., 1999. Utilization of lipids by *Dentex dentex* L. (Osteichthyes, Sparidae) larvae during lecithotrophia and subsequent starvation. *Fish Physiol. Biochem.* 21, 45-58.
- Murray, H.M., Hew, C.L., Fletcher, G.L., 2003. Spatial expression patterns of skin-type antifreeze protein in winter flounder (*Pseudopleuronectes americanus*) epidermis following metamorphosis. *J. Morphol.* 257, 78-86.
- Naas, K.E., Nress, T., Harboe, T., 1992. Enhanced first-feeding of halibut larvae (*Hippoglossus hippoglossus* L.) in green water. *Aquaculture* 105, 143-156.

- Naess, T., Germain-Henry, M., Naas, K.E., 1995. First feeding of Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*) using different combinations of *Artemia* and wild zooplankton. *Aquaculture* 130, 235-250.
- Navarro, J.C., Henderson, R.J., McEvoy, L.A., Bell, M.V., Amat, F., 1999. Lipid conversions during enrichment of *Artemia*. *Aquaculture* 174, 155-166.
- Naveh, N., Kaplan-Messas, A., Marshall, J., 2000. Mechanism related to reduction of intraocular pressure by melanocortins in rabbits. *Brit. J. Ophthalmol.* 84, 1411-1414.
- Nelson, J.S., 1994. *Fishes of the world*, 3<sup>rd</sup> ed. Wiley J. and sons, Inc., New York. 316p.
- Neuman, M.J., Able, K.W., 2002. Quantification of ontogenic transitions during the early life of a flatfish, windowpane, *Scophthalmus aquosus* (Pleuornectiformes Scophthalmidae). *Copeia* 2002, 597-606.
- Nishikawa, Y., Ueyanagi, S., 1991. Morphological development of longtail tuna. *Bull. Nat. Res. Inst. Far Sea. Fish.* 28, 1-13.
- O'Connell C.P., 1981. Development of organ systems in the northern anchovy, *Engraulis mordax*, and other teleosts. *American Zool.* 21, 429-446.
- Ortiz Delgado, J.B., Ruane, N.M., Pousao-Ferreira, P., Dinis, M.T., Sarasquete, C., 2006. Thyroid gland development in Senegalese sole (*Solea senegalensis* Kaup 1858) during early life stages: A histochemical and immunohistochemical approach. *Aquaculture* 260, 346-356.
- Otsuka, M., 2003. Neuromast formation in the prehatching embryos of the Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*). *Acta Zool.* 84, 99-106.
- Ottensen, O.H., Olafsen, J.A., 1997. Ontogenic development and composition of the mucous cells and the occurrence of saccular cells in the epidermis of Atlantic halibut. *J. Fish Biol.* 50, 620-633.
- Owen, J.M., Adron, J.A., Middleton, C., Cowey, C.B., 1975. Elongation and desaturation of dietary fatty acids in turbot (*Scophthalmus maximus*) and rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Lipids* 10, 528-531.

- Padrós, F., 1994. Aspectos histológicos y ultraestructurales del desarrollo larvario del rodaballo (*Scophthalmus maximus* Linnaeus, 1788) y estudio histopatológico de las alteraciones observadas en su cultivo. Tesis Doctoral, Universitat Autònoma de Barcelona.
- Padrós, F., Crespo, S., 1996. Ontogeny of the lymphoid organs in the turbot *Scophthalmus maximus*: a light and electron microscope study. *Aquaculture* 144, 1-16.
- Padrós, F., Zarza, C., Estévez, A., Crespo, S., Furones, M.D., 2003. La patología como factor limitante para el desarrollo del cultivo del lenguado. Proc. IX Congr. Nal. Acuicultura, Cádiz, Spain, 343-345.
- Parra, G., 1998. Fisiología y balance energético durante el desarrollo larvario de peces marinos (*Solea senegalensis* Kaup y *Sparus aurata* Linneo) en cultivo. Tesis Doctoral. Universidad de Cádiz.
- Paulin, M.G., 1993. The role of the cerebellum in motor control and perception. *Brain, Behav. Evol.* 41, 39-50.
- Pelster, B., Burggren, W.W., 1996. Disruption of haemoglobin oxygen transport does not impact oxygen-dependent physiological processes in developing embryos of zebrafish (*Danio rerio*). *Circ. Res.* 79, 358-362.
- Petrik, M.B.H., McEntee, M.F., Johnson, B.T., Obykowicz, M.G., Whelan, J., 2000. Highly unsaturated (n-3) fatty acids, but not  $\alpha$ -linolenic, conjugated linoleic or  $\gamma$ -linolenic acids, reduce tumorigenesis in *Apc*<sup>Min/+</sup>Mice. *J. Nutr.* 130, 2434-2443.
- Piñuela, C., Rendón, C., González de Canales, M.L., Sarasquete, C., 2004. Development of the Senegal sole, *Solea senegalensis* forebrain. *Europ. J. Histochem.* 48, 377-384.
- Pittman, K., Skiftesvik, A.B., Berg, L., 1990. Morphological and behavioural development of halibut, *Hippoglossus hippoglossus* (L.) larvae. *J. Fish Biol.* 37, 455-472.

- Plisetskaya, E.M., Batacharya, S., Dickhoff, W.W., Gorbman, A. 1984. The effect of insulin on amino acid metabolism and glycogen content in isolated liver cells of juvenile coho salmon, *Oncorhynchus kisutch*. *Comp. Biochem. Physiol.* 78, 773-778.
- Policansky, D., 1982. Influence of age, size, and temperature on metamorphosis in the starry flounder (*Platichthys stellatus*). *Can. J. Fish. Aquat.* 39, 514-517.
- Powell, W.S., 1982. Rapid extraction of arachidonic acid metabolites from biological samples using octadecyl silica. *Methods Enzymol.* 86, 467-477.
- Rainuzzo, J.R., Reitan, K.I., Jorgesen, L., 1991. Fatty acid and lipid utilization in yolk-sac stage of marine fish larvae. *EAS Spec. Publ.* 15, 26-29.
- Rainuzzo, J.R., Reitan, K.I., Jorgensen, L., Olsen, Y., 1994. Lipid composition in turbot larvae fed live feed cultured by emulsions of different lipid classes. *Comp. Biochem. Physiol.* 107, 699-710.
- Rainuzzo, J.R., Reitan, K.I., Olsen, Y., 1997. The significance of lipids at early stages of marine fish: a review. *Aquaculture* 155, 103-115.
- Ramachandran, V.S., Tyler, C.W., Gregory, R.L., Rogers-Ramachandran, D., Duensing, S., Pillsbury, C., Ramachandran, C., 1996. Rapid adaptive camouflage in tropical flounders. *Nature* 379, 815-818.
- Ramos, J., 1977. Primeras experiencias de cría del lenguado (*Solea solea* L.). *Inf. Técn. Inst. Inv. Pesq.* 48, 1-13.
- Reitan, K.I., Rainuzzo, J.R., Olsen, Y., 1994. Influence of live feed on growth, survival and pigmentation of turbot larvae. *Aquac. Int.* 2, 33-48.
- Reitan, K.I., Rainuzzo, J.R., Oeie, G., Olsen, Y., 1997. A review on the nutritional effects of algae in marine fish larvae. *Aquaculture* 155, 211-225.
- Ribeiro, L., Sarasquete, C., Dinis, M.T., 1999. Histological and histochemical development of the digestive system of *Solea senegalensis* (Kaup, 1858) larvae. *Aquaculture* 171, 293-308.

- Ribeiro, L., Engrola, S., Dinis, M.T., 2003. Weaning of Senegal sole, *Solea senegalensis*, post-larvae. Proc. World Aquaculture 2003, Salvador de Bahía, Brasil.
- Richman, N. H. and Zaugg, W. S., 1987. Effects of cortisol and growth hormone on osmoregulation in pre- and desmoltified coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*). Gen. Comp. Endocrinol. 65, 189-198.
- Roberts, R.J., Bell, M., Young, H., 1973. Studies on the skin of plaice (*Pleuronectes platessa* L.) II. The development of larval plaice skin. J. Fish Biol. 5, 103-108.
- Rodríguez, C., Pérez, J.A., Lorenzo, A., Izquierdo, M.S., Cejas, J.R., 1994. n-3 HUFA requirement of larval gilthead seabream (*Sparus aurata*) when using high levels of eicosapentaenoic acid. Comp. Biochem. Physiol. 107, 693-698.
- Rodríguez, C., Pérez, J.A., Díaz, M., Izquierdo, M.S., Fernández-Palacios, H., Lorenzo, A., 1997. Influence of the EPA/DHA ratio in rotifers on gilthead seabream (*Sparus aurata*) larval development. Aquaculture 150, 77-89.
- Rodríguez, C., Pérez, J.A., Henderson, R.J., 2002. The sterification and modification of n-3 and n-6 polyunsaturated fatty acids by hepatocytes and liver microsomas of turbot (*Scophthalmus maximus*). Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol. 132, 559-570.
- Rombough, P.J., 2004. Gas Exchange, Ionoregulation, and the Functional Development of the Teleost Gill. American Fish. Soc. Symp. 40, 47-83.
- Ronnestad, I., Hemre, G.I., Finn, R.N., Lie, O., 1998a. Alternate sources and dynamics of vitamin A and its incorporation into the eyes during the early endotrophic and exotrophic larval stages of Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus* L.). Comp. Biochem. Physiol. 119(A), 787-793.
- Ronnestad, I., Hellend, S., Lie, O., 1998b. Feeding *Artemia* to larvae of Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus* L.) results in lower larval vitamin A content compared with feeding copepods. Aquaculture 165, 159-164.

- Rønnestad, I., Conceição, L.E.C., Aragao, C., Dinis, M.T., 2000. Free amino acids are absorbed faster and assimilated more efficiently than protein in postlarval Senegal sole (*Solea senegalensis*). J. Nutr. 130, 2809-2812.
- Rønnestad, I., Conceição, L.E.C., Aragao, C., Dinis, M.T., 2001. Assimilation and catabolism of dispensable and indispensable free amino acids in post-larval Senegal sole (*Solea senegalensis*). Comp. Biochem. Physiol., Part C Pharmacol. Toxicol. 130, 461-466.
- Sá, R., Bexiga, C., Vieira, L., Veiga, P., Erzini, K., 2003. Diets of the sole *Solea vulgaris* Quensel, 1806 and *Solea senegalensis* Kaup, 1858 in the lower estuary of the Guadiana River (Algarve, southern Portugal): Preliminary results. Bol. Inst. Esp. Oceanogr. 19, 505-508.
- Saele, O., Solbakken, J.S., Watanabe, K., Hamre, K., Pittman, K., 2003. The effect of diet on ossification and eye migration in Atlantic halibut larvae. Aquaculture 220, 683-696.
- Sage, M., 1973. The evolution of thyroidal function in fishes. Am. Zool. 13, 899-905.
- Sandy, J.M., Blaxter, J.H.S., 1980. A study of retinal development in larval herring and sole. J. Mar. Biol. Ass. 60, 59-71.
- Sarasquete, C., González de Canales, M.L., Arellano, J.M., Muñoz-Cueto, J.A., Ribeiro, L., Dinis, M.T., 1996. Histochemical aspects of the yolk-sac and digestive tract of larvae of the Senegal sole, *Solea senegalensis*. Histol. Histopathol. 11, 881-888.
- Sargent, J.R., Falk-Peterson, S., 1988. The lipid biochemistry of calanoid copepods. Hydrobiology 167/168, 101-114.
- Sargent, J.R., 1989. Ether-linked glycerides in marine animals. En: Ackman, R.G. (Ed.), Marine Biogenic Lipids. Fats and Oils. Boca Raton, Florida: CRC Press, pp. 175-198.
- Sargent, J.R., Henderson, R.J., Tocher, D.R., 1989. The lipids. En: Halver, J.E. (Eds.), Fish Nutrition. Academic Press, San Diego, CA, pp. 153-218.

- Sargent, J.R., 1995. Origins and functions of lipids in fish eggs: nutritional implications. En: Bromage, N.R., and Roberts, R.R. (Eds.), *Broodstock Management and Egg and Larval Quality*. Oxford: Blackwell Science, pp. 353-372.
- Sargent, J.R., Bell, J.G., Bell, M.V., Henderson, R.J., Tocher, D.R., 1995. Requirement criteria for essential fatty acids. *J. Appl. Ichthyol.* 11,183-198.
- Sargent, J.R., McEvoy, L.A., Bell, J.G., 1997. Requirements, presentation and sources of polyunsaturated fatty acids in marine fish larval feeds. *Aquaculture* 155, 117-127.
- Sargent, J.R., Bell, J.G., McEvoy, L.A., Tocher, D.R., Estevez, A., 1999a. Recent developments in the essential fatty acid nutrition of fish. *Aquaculture* 177, 191-199.
- Sargent, J.R., McEvoy, L.A., Estevez, A., Bell, J.G., Bell, M.V., Henderson, R.J., Tocher, D.R., 1999b. Lipid nutrition of marine fish during early development: current status and future directions. *Aquaculture* 179, 217-229.
- Sargent, J.R., Tocher, D.R., Bell, J.G., 2002. The Lipids. En: Halver, J.E. (Ed.), *Fish Nutrition*, Chap. 4. San Diego: Academics Press, pp. 181-257.
- Schreck, C.B., Scanlon, P.F., 1977. Endocrinology in fisheries and wildlife biology and management. *Fish.* 2, 20-27.
- Schreiber, A.M., Specker, J.L., 1999. Metamorphosis in the summer flounder *Paralichthys dentatus*: changes in gill mitochondria-rich cells. *J. Exp. Biol.* 202, 2475-2484.
- Segner, H., Storch, V., Reinecke, M., Kloas, W., Hanke, W., 1994. The development of functional digestive and metabolic organs in turbot, *Scophthalmus maximus*. *Mar. Biol.* 119, 471-486.
- Segner, H., Storch, V., Reinecke, M., Kloas, W., Hanke, W., 1995. A tabular overview of organogenesis in larval turbot (*Scophthalmus maximus* L.). *ICES Mar. Sci. Symp.* 201, 35-39.



- Seikai, T., Shimozaki, M., Watanabe, T., 1987. Estimation of larval triglycerides determining the appearance of albinism in hatchery-reared juvenile flounder *Paralichthys olivaceus*. Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish. 51, 521-527.
- Seikai, T., 1991. Influences of fluorescent light irradiation, ocular side pigmentation, and source of fishes on the blind side pigmentation in the young Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*. Suisanzoshoku 39, 173-180.
- Seikai, T., Matsumoto, J., 1991. Mechanisms of albinism in flatfish with regard to pigment cells and skin differentiation. En: Lavens, P., Sorgeloos, P., Jaspers, E., Ollevier, F. (Eds.), Larvi '91. Fish and Crustacean Larviculture Symposium. Special Publication no. 15, European Aquaculture Society, Ghent, pp. 328-330.
- Shearer, K.D., 2000. Experimental design, statistical analysis and modeling of dietary nutrient requirement studies for fish: a critical review. Aquac. Nutr. 6, 91-102.
- Shields, R.J., Bell, J.G., Luizi, F.S., Gara, B., Bromage, N.R., Sargent, J.R., 1999. Natural copepods are superior to enriched *Artemia* nauplii as feed for halibut larvae (*Hippoglossus hippoglossus*) in terms of survival, pigmentation and retinal morphology: relation to dietary fatty acids. J. Nutr. 129, 1186-1194.
- Sokal, R.R., Rohlf, F.J., 1995. Biometry. Freeman, NY, USA. 859 pp.
- Solbakken, J.S., Norberg, B., Watanabe, K., Pittman, K., 1999. Thyroxine as a mediator of metamorphosis of Atlantic halibut, *Hippoglossus hippoglossus*. Environ. Biol. Fishes 56, 53-65.
- Solbakken, J.S., Berntssen, M.H.G., Norberg, B., Pittman, K., Hamre, K., 2002. Different iodine and thyroid hormone levels between Atlantic halibut larvae fed wild zooplankton or *Artemia* from exogenous feeding until post metamorphosis. J. Fish Biol. 61, 1345-1362.
- Sostoa, A., 1990. Història Natural dels Països Catalans. Vol. 11: Peixos. Barcelona: Enciclopèdia Catalana.

- Surette, M.E., Edens, M., Chilton, F.H., Tramposch, K.M., 2004. Dietary echium oil increases plasma and neutrophil long-chain (n-3) fatty acids and lowers serum triacylglycerols in hypertriglyceridemic humans. *J. Nutr.* 134, 1406-1411.
- Takeuchi, T., Dedi, J., Ebisawa, C., Watanabe, T., Seikai, T., Hosoya, K., Nakazoe, J., 1995. The effect of beta-carotene and vitamin A enriched *Artemia* nauplii on the malformation and color abnormality of larval Japanese flounder. *Fish. Sci.* 61, 141-148.
- Takeuchi, T., Masuda, R., Ishizaki, Y., Watanabe, T., Kanematsu, M., Imaizumi, K., Tsukamoto, K., 1996. Determination of the requirement of larval striped jack for eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid using enriched *Artemia* nauplii. *Fish. Sci.* 65, 760-765.
- Takeuchi, T., Dedi, J., Haga, Y., Seikai, T., Watanabe, T., 1998. Effect of vitamin A compounds on bone deformity in larval Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*). *Aquaculture* 169, 155-165.
- Tanaka, M., Tanangonan, J.B., Tagawa, M., de Jesus, E.G., Nishida, H., Isaka, M., Kimura, R., Hirano, T., 1995. Development of the pituitary, thyroid and interrenal glands and applications of endocrinology to the improved rearing of marine fish larvae. *Aquaculture* 135, 111-126.
- Tanaka, M., Kawai, S., Seikai, T., Burke, J.S., 1996. Development of the digestive organ system in Japanese flounder in relation to metamorphosis and settlement. *Marine Fresh. Behav. Physiol.* 28, 19-31.
- Tocher, D.R., Sargent, J.R., 1984. Analyses of lipids and fatty acids in ripe roes from some northwest European marine fish. *Lipids* 19, 492-499.
- Tocher, D.R., Sargent, J.R., 1986. Incorporation of [1-14C] arachidonic and [1-14C] eicosapentaenoic acid into the phospholipids of peripheral blood neutrophils from the plaice *Pleuronectes platessa* L. *Biochim. Biophys. Acta* 876, 592-600.

- Tocher, D.R., 2003. Metabolism and Functions of Lipids and Fatty Acids in Teleost Fish. *Rev. Fish. Sci.* 11(2), 107-184.
- Tzoumas, A.P., 1988. The nutritional value of freshly hatched and enriched *Artemia* nauplii for sole larvae (*Solea solea*), from the standpoint of their polyunsaturated fatty acid content. Master Thesis. University of Stirling.
- Varsamos, S., Diaz, J.P., Charmantier, G., Blasco, C., Connes, R., Flik, G., 2002. Location and morphology of chloride cells during the post-embryonic development of the European sea bass, *Dicentrarchus labrax*. *Anat. Embryol.* 205, 203-213.
- Vázquez, R., González, S., Rodríguez, A., Mourente, G., 1994. Biochemical composition and fatty acid content of fertilized eggs, yolk sac stage larvae and first-feeding larvae of the Senegal sole (*Solea senegalensis* Kaup). *Aquaculture* 119, 273-286.
- Venizelos, A., Benetti, D.D., 1999. Pigment abnormalities in flatfish. *Aquaculture* 176, 181-188.
- Villalta, M., Estévez, A., 2005. Culture of Senegal sole larvae without the need for rotifers. *Aquac. Int.* 13, 469-478.
- Villalta, M., Estévez, A., Bransden, M.P., 2005a. Arachidonic acid enriched live prey induces albinism in Senegal sole (*Solea senegalensis*) larvae. *Aquaculture* 245, 193-209.
- Villalta, M., Estévez, A., Bransden, M.P., Bell, J.G., 2005b. The effect of graded concentrations of dietary DHA on growth, survival and tissue fatty acid profile of Senegal sole (*Solea senegalensis*) larvae during the *Artemia* feeding period. *Aquaculture* 249, 353-365.
- Wales, W., Tytler, P., 1996. Changes in chloride cell distribution during early larval stages of *Clupea harengus*. *J. Fish Biol.* 49, 801-814.
- Waser, W.P., Heisler, N., 2004. Oxygen delivery to the fish eye: blood flow in the pseudobranchial artery of rainbow trout (*Onchorynchus mykiss*). *Fish Physiol. Biochem.* 30, 77-85.

- Watanabe, T., 1982. Lipid nutrition in fish. *Comp. Biochem. Physiol.* 73B, 3-15.
- Watanabe, T., 1993. Importance of docosahexaenoic acid in marine larval fish. *J. World Aquac. Soc.* 24, 152-161.
- Werner, R.G., Blaxter, J.H.S., 1980. Growth and survival of larval herring (*Clupea harengus*) in relation to prey density. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 37, 1063-1069.
- Werner, R.G., Blaxter, J.H.S., 1981. The effect of prey density on mortality, growth and food consumption in larval herring (*Clupea harengus* L.). *Rapports du Conseil International pour la Exploration de la Mer* 178, 405-408.
- Willett, C.E., Cortes, A., Zuasti, A., Zapata, A.G., 1999. Early hematopoiesis and developing lymphoid organs in the Zebrafish. *Develop. Dynam.* 214, 323-336.
- Willey, S., Bengtson, D.A., Harel, M., 2003. Arachidonic acid requirements in larval summer flounder *Paralichthys dentatus*. *Aquac. Int.* 11, 131-149.
- Yamamoto, T.S., Fukusho, K., Okauchi, M., Tanaka, H., Nagata, W.D., Seikai, T., Watanabe, T., 1992. Effects of various foods during metamorphosis on albinism in juvenile of flounder. *Nippon Suisan Gakkaishi* 58, 499-508.
- Yasunaga, Y., 1971. Studies on the feeding habit and growth of the plaice, *Paralichthys olivaceus*, in the larval stage. *Bull. Tokai Regional Fish. Res. Lab.* 68, 31-43.
- Yoshimatsu, T., Kitajima, C., 1996. Effects of daily ration and feeding frequency of *Artemia* on the growth of mullet larvae. *Aquac. Int.* 4, 85-88.
- Young, G., McCormick, S.D., Bjornsson, B.T., Bern, H.A., 1995. Circulating growth hormone, cortisol and thyroxine levels after 24 h seawater challenge of yearling coho salmon at different developmental stages. *Aquaculture* 136, 371 -384.
- Youson, J.H., 1988. Fish metamorphosis. En: Hoar, W.S., Randall, D.J. (Eds.), *Fish Physiology*, col. XI, Part B. Academic Press, New York, pp. 135-196.
- Yúfera, M., 1982. Aislamiento, caracterización y puesta en cultivo de una cepa de pequeño tamaño de *Brachionus plicatilis* O.F. Muller (1786). Tesis Doctoral. Universidad de Sevilla.

- Yúfera, M., Parra, G., Santiago, R., Carrascosas, M., 1999a. Growth, carbon, nitrogen and caloric content of *Solea senegalensis* (Pisces: Soleidae) from egg fertilization to metamorphosis. Mar. Biol. 134, 43-49.
- Yúfera, M., Pascual, E., Fernández-Díaz, C., 1999b. A highly efficient microencapsulated food for rearing early larvae of marine fish. Aquaculture 177, 249-256.
- Zarza, C., Padrós, F., Estévez, A., Crespo, S., Furones, M.D., 2003. New fish species for aquaculture, old pathological problems: the case of *Solea* sp. Proc. 11<sup>th</sup> European Assoc. Fish Pathologist, St Julians, Malta.



## ***13. ANEXOS***





## Culture of Senegal sole larvae without the need for rotifers

MIREIA VILLALTA<sup>1,2,3,\*</sup> and ALICIA ESTÉVEZ<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Centro de Acuicultura-IRTA, Ctra. Poble Nou Km 6, San Carlos de la Rápita, 43540 Tarragona, Spain; <sup>2</sup>Reference Center of Aquaculture, Generalitat de Catalunya, Spain; <sup>3</sup>Universidad Autónoma de Barcelona, programa de doctorado en Acuicultura; \*Author for correspondence (e-mail: mireia.villalta@irta.es; phone: +34-977745427; fax: +34-977744138)

Received 11 June 2004; accepted in revised form 9 May 2005

**Key words:** Eye migration, Growth, Larviculture, Senegal sole, Survival

**Abstract.** Two groups of Senegal sole (*Solea senegalensis*) larvae were cultured. One used rotifers for the first 10 days after hatching (dph) and enriched *Artemia* metanauplii from 6 to 30 dph and the other without rotifers, using enriched *Artemia* metanauplii as the sole food source. The quantity of metanauplii used was the same (group A), twice (group A2) and three times (group A3) the quantity of live prey (in dry weight) of the group fed with rotifers (group R). At the end of the experiment, the growth, in terms of total length and individual dry weight was significantly higher for the larvae on group A2 whilst rotifer fed larvae (R) showed the poorest results. Eye migration was also delayed by approximately 2 days in the group R. No significant differences were found in survival rates. The influence of diet on Senegal sole metamorphosis and its relationship with the size rather than the age of the fish are discussed.

### Introduction

Senegal sole is one of the new candidate species for aquaculture in the Mediterranean coast and especially in the Iberian Peninsula (Dinis 1992; Dinis et al. 1999). The on-growing of this species is carried out under extensive conditions that allow the commercial exploitation of once industrially abandoned areas of marshlands and salt water ponds (Drake et al. 1984). Although plenty of literature has been published about larval rearing of common sole *Solea solea* (see review by Howell 1997) little has been done with Senegal sole and literature regarding aspects such as nutritional requirements of larvae and juveniles, and larviculture of this species, is very scarce (Dinis 1992; Cañavate and Fernández-Díaz 1999; Martínez et al. 1999; Dinis et al. 2000; Fernández-Díaz et al. 2001). The feeding regime generally used for sole larviculture is based on the use of rotifer for 10 days after hatching and *Artemia* metanauplii from days 4–5 post hatching until the weaning onto artificial diets (Dinis 1992; Cañavate and Fernández-Díaz 1999; Martínez et al. 1999). New research for the reduction of production cost and labour in larval fish culture is focused on the replacement of live food with artificial diets (Yúfera et al. 1999) or by the use of

feeding regimes designed to reduce the use of live food and to produce faster growth. Fernández-Díaz et al. (2001) obtained lower growth and survival rates, as well as delayed metamorphosis, when microdiets were used for Senegal sole larval feeding. Larvae could ingest the artificial diets but the digestive capacity of the larvae were very reduced and the body reserves were not sufficient for the anatomic transformation, somatic growth and maintenance activity. Therefore, it is still too early for the use of microdiets but not for the use of *Artemia* nauplii as the only food source for Senegal sole (Dinis et al. 1999). The main objective of the present study is to compare the technique usually employed in Spanish sole farms with rotifers and *Artemia* as live prey with the use of *Artemia* nauplii as the only food source in terms of larval growth and survival as well as the development of the larvae in terms of eye migration.

## Materials and methods

### *Larvae*

Eggs used in the study were generously provided by CIFPA 'El Toruño' (Cádiz, Spain). They were obtained from a captive broodstock that spawned naturally in their facilities and which were then transported to CA-IRTA. Incubation and larval culture were carried out in twelve 50 l mesh tanks (150  $\mu$  m pore size) provided with air-lifts that were distributed in two holding tanks of 1500 l. The tanks were connected to a recirculation device described elsewhere (Carbó et al. 2002) that maintained constant physico-chemical and biological conditions during the duration of the experiment. A total of 4345 eggs were distributed in each mesh tank, considering a 60% hatching rate and a density of 50 larvae per litre.

### *Culture conditions*

Water conditions were as follows: oxygen  $8 \pm 1$  mg l<sup>-1</sup>, temperature  $20 \pm 1$  °C, salinity  $36 \pm 1$  g l<sup>-1</sup>, pH  $8 \pm 0.5$ . Photoperiod was 12 h L:12 h D. Nitrites and ammonia levels were kept at 0.012–0.036 and 0.14–0.22 mg l<sup>-1</sup>.

The green water technique (Reitan et al. 1997) was used for the first 10 days of culture using 30 l of concentrated cultures of the algae *Isochrysis galbana* and *Nannochloropsis gaditana* under static conditions. This was then followed by a daily 200% exchange of the water (2.5 l min<sup>-1</sup> flowrate).

### *Feeding*

Four different feeding regimes were established and used in triplicate. The R group was fed following the method of Cañavate and Fernández-Díaz (1999),

using 20 rot  $\text{ml}^{-1}$  of S-1 strain as the first prey ( $3.7 \text{ mg l}^{-1}$ ), considering an individual dry weight of  $0.185 \mu\text{g}$  (Yúfera 1982) followed by *Artemia* metanauplii at a density of 4 metanauplii  $\text{ml}^{-1}$ . Groups A, A2 and A3 were fed exclusively on enriched *Artemia* metanauplii (strain EG, INVE) at the same initial equivalent weight as group R ( $4 \text{ mg l}^{-1}$ , that means 1.4 metanauplii  $\text{ml}^{-1}$ , considering the dry weight of enriched metanauplii as  $2.77 \mu\text{g}$ , personal observation 2002), twice ( $2.8 \text{ metanauplii ml}^{-1}$ ) and three times ( $4.2 \text{ metanauplii ml}^{-1}$ ), respectively. The number of *Artemia* metanauplii was increased gradually, following the feeding regime published by Fernández-Díaz et al. (2001) at  $20^\circ\text{C}$  as shown in Table 1.

Live prey were enriched with a commercial product (DHA Protein Selco, INVE) at  $0.15 \text{ g l}^{-1}$  for 6 h for rotifers and  $0.3 \text{ g l}^{-1}$  for 18 h for nauplii. Enriched live prey were concentrated and washed thoroughly with sea water followed by a freshwater wash (1 min for rotifers, 15 min for metanauplii) to reduce the bacterial load and distributed to the larvae. Live prey were supplied as two doses per day and stored between doses in UV-filtered seawater at  $4^\circ\text{C}$ . Dead larvae and unenriched *Artemia* metanauplii were siphoned daily ensuring that disenriched prey did not remain in the tanks for more than 12 h.

### Sampling

Twenty larvae from each replicate tank were collected before prey distribution on days 4, 6, 10, 12, 15, 20 and 30 after hatching (dph). Total length and eye migration stage (Fernández-Díaz et al. 2001) were measured on live anaesthetised fish before they were dried in an oven at  $60^\circ\text{C}$  for 24 h for dry weight determination. Although Fernández-Díaz et al. (2001) described 4 different eye migration stages, we have considered stage 3b (advanced mid migration) as another step of the process. The eye migration index ( $I_{EM}$ , Solbakken et al. 2002) was calculated using the mean value of the eye position (0–5) observed in each sampling period. At the end of the study the surviving fish were counted and the number of poorly pigmented or deformed individuals were noted. Five

Table 1. Daily amounts of live prey given to each replicate tank containing *Solea senegalensis* larvae under 4 different feeding regimes.

Group:	R			A		A2		A3	
Age (DAH)	Rotifers, $\text{ml}^{-1}$	Nauplii, $\text{ml}^{-1}$	$\text{mg l}^{-1}$	Nauplii, $\text{ml}^{-1}$	$\text{mg l}^{-1}$	Nauplii, $\text{ml}^{-1}$	$\text{mg l}^{-1}$	Nauplii, $\text{ml}^{-1}$	$\text{mg l}^{-1}$
2–5	20	–	3.7	1.3	3.7	2.7	7.4	4.0	11.1
6–10	20	–	3.7	2.8	7.8	5.8	16.1	8.7	24.1
11–15	–	4	11.1	4.8	13.3	7.8	21.6	10.7	29.6
16–30	–	5	13.9	5.8	16.1	8.8	24.4	11.7	32.4

Weight of live prey given was calculated considering S-1 rotifer strain to be  $0.185 \mu\text{g individual}^{-1}$  and *Artemia* nauplius to be  $2.77 \mu\text{g individual}^{-1}$ .

472

percent of the survivors were sampled to measure the final length, and to determine dry weight and eye migration index.

### Statistics

All the statistical analyses were performed with Statgraphics (Microsoft Inc.). The final results of growth measured as length and weight, eye migration and survival were tested using a one way ANOVA with feeding regime as independent variable. Percentage data were square root transformed prior to analysis. A Tukey test was used for *post hoc* comparisons of means. The significance level used was  $p \leq 0.05$  in all cases. Due to the observed high variation in weights a transformation  $(\text{weight})^{-0.4}$  was performed before the analysis, following the recommendation of the Statistical Unit at IRTA.

### Results

The results in growth are presented in Figure 1. During the initial days of larval rearing growth measured by length was very similar in all the groups. Significant differences were found at days 12 (data not shown), 20 and 30 dph (ANOVA,  $p < 0.05$ ), with groups R and A2 showing the lowest and the highest increments in larval length, respectively. Table 2 summarises the results obtained in terms of larval length and weight, standard growth rate and survival. No significant differences could be found in the latter.

Figure 2 shows the frequency histograms for larvae at each stage of eye migration. Almost all the individuals (98%) fed exclusively on *Artemia* metanauplii (groups A, A2 and A3) had completed eye migration by the end of the experiment, while in the R group 15% of the fish were still in the early phases (stages 2 and 3). The fish of the R group had a delayed eye migration, reaching each migration stage with a lower length than the groups fed on metanauplii. A clear relationship was found between larval length and eye position ( $R^2 = 0.96$ ,  $n = 1483$  larvae), which could be adjusted to the following sigmoid regression:

$$I_{EM} = 4.990/1 + (\text{length}/6.376)^{-11.34}$$

### Discussion

The use of *Artemia* nauplii as the only food for common sole (*S. solea*) larviculture is well documented (Howell 1997). However, this feeding regime although essayed previously (Dinis et al. 1999) has not been used for

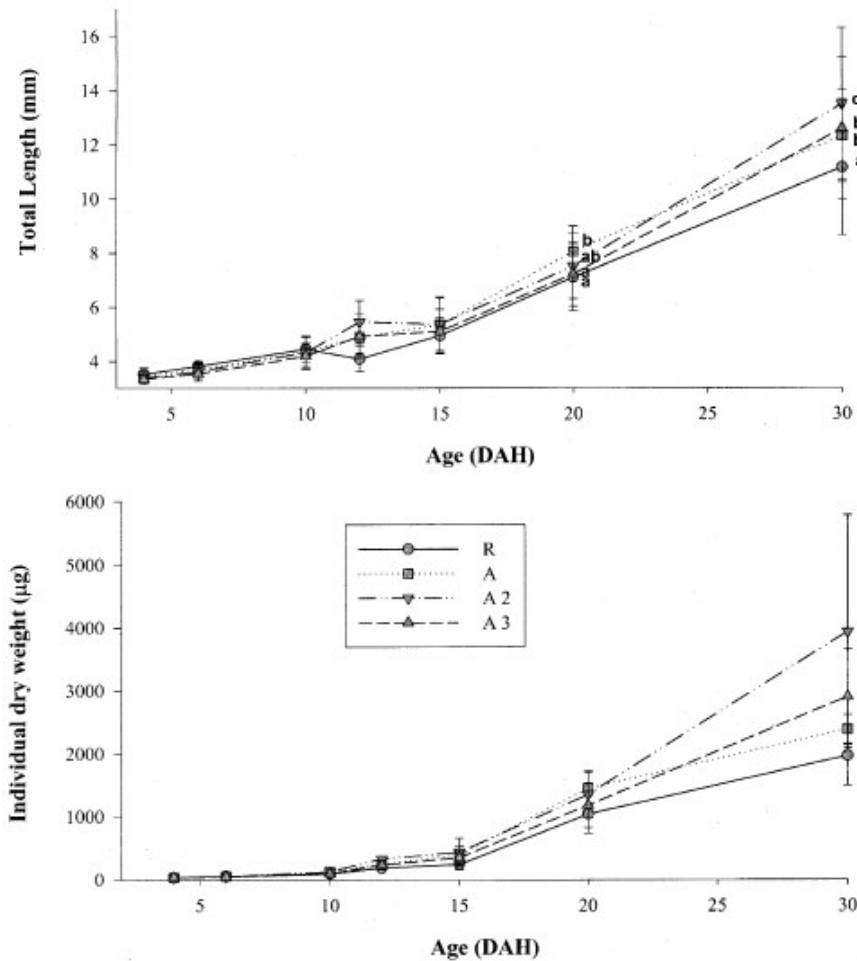


Figure 1. Growth in total length and dry weight of Senegal sole larvae. Values are the means of triplicate samples of 20 larvae. Vertical bars are standard deviations and letters indicate significant differences between treatments (ANOVA,  $p < 0.05$ ).

Table 2. Total length, dry weight, survival (sampled fish not included) and standard growth rate (SGR in percentage per day, Hopkins, 1982) obtained at the end of the feeding period.

	Length (mm)	Dry weight ( $\mu\text{g}$ )	Survival (%)	SGR <sub>4-10</sub>	SGR <sub>12-30</sub>	SGR <sub>4-30</sub>
R	11.16 $\pm$ 2.51 a	1961.85 $\pm$ 470.21	29.05 $\pm$ 10.50	15.54	17.57	15.12
A	12.33 $\pm$ 1.72 b	2380.55 $\pm$ 229.01	35.82 $\pm$ 0.65	17.51	12.76	16.06
A2	13.50 $\pm$ 3.68 c	3933.91 $\pm$ 1849.96	32.44 $\pm$ 20.35	20.02	13.77	17.98
A3	12.60 $\pm$ 2.63 b	2893.91 $\pm$ 760.52	44.14 $\pm$ 9.94	16.77	14.00	16.98

Different letters indicate significant differences between groups (ANOVA,  $p < 0.05$ ). Global (SGR<sub>4-30</sub>) and partial SGR were calculated for the premetamorphosis (SGR<sub>4-10</sub>) and metamorphosis (SGR<sub>12-30</sub>) periods.

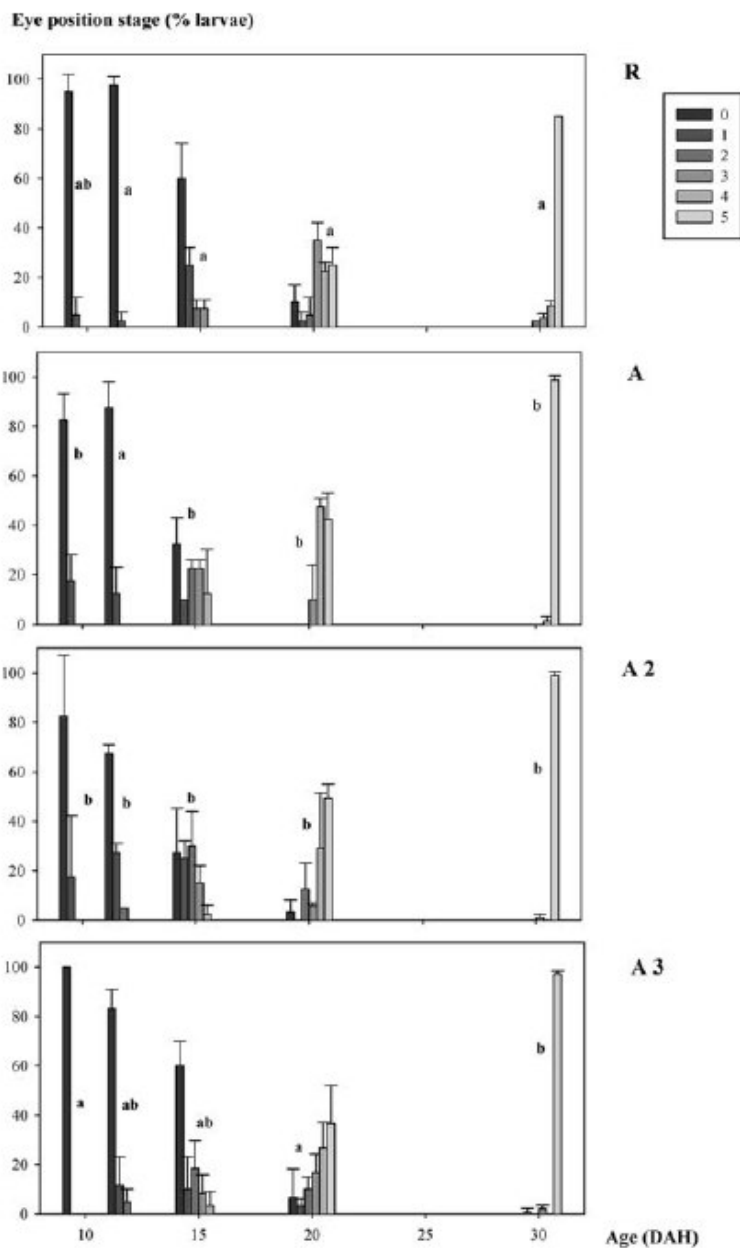


Figure 2. Frequency histograms of the different metamorphosis stages in relation to age post hatching of the experimental groups. Bars are the standard deviations and letters indicate significant differences between groups (ANOVA,  $p < 0.05$ ). Stages 0–5 as in Fernández-Díaz et al. (2001): stage 0, symmetric larvae. Vertical swimming plane; stage 1, left eye starts migration. Individuals not completely symmetrical; stage 2, the migrating eye can be seen from the right-ocular side; stage 3, eye continues migration. Individuals change the swimming plane; stage 4, (3b in Fernández-Díaz et al. 2001) left eye reaches right side. Orbital arch is being formed; stage 5, (4 in Fernández-Díaz et al. 2001) eye translocation is completed. Orbital arch is clearly visible.

*S. senegalensis* culture at an industrial scale. Marín-Magán et al. (1995) reported selective rotifer capture in Senegal sole larvae until 7 dph, with a subsequent change in preference to *Artemia*, and they consequently recommended the use of rotifers as larval food up to day 9. The results of the present work showed that Senegal sole larvae were able to capture enriched metanauplii after mouth opening without any differences in survival compared with larvae fed on rotifers. When enriched metanauplii were present in sufficient quantity larval growth and development occurred faster than in larvae fed on rotifers during the first 10 days after hatching.

At the end of the study, there was a clear effect of the quantity of metanauplii supplied to the larvae on growth rate, with the A2 treatment ( $8.0 \text{ mg l}^{-1}$ ) being the most effective. Treatments with a lower ( $3.7 \text{ mg l}^{-1}$ , R and A groups) or higher ( $11.1 \text{ mg l}^{-1}$ ) prey supply had poorer results in terms of growth. Yasunaga (1971) and Yoshimatsu and Kitajima (1996) reported a daily ration of 40–60% of the fish body weight as the minimum required to obtain optimal growth results for flatfish and red sea bream. Similar results have been obtained with freshwater fishes (Marmulla and Rösch 1990). In the present work, groups R and A received rations of 35–60% and 58–140% of the body weight, respectively, in the stages prior to metamorphosis. After metamorphosis, all the groups received rations lower than 20%, which is considered sufficient to maintain growth (Laurence 1977) bearing in mind that during metamorphosis there is a decrease in routine metabolism and an increased efficiency of prey capture. The lower growth rates observed in groups R and A could be due to a sub-optimal feeding after metamorphosis. This could be a consequence of the low rate of ration increase during this period that did not keep pace with the increasing demands of the larvae, although in all cases the growth rate is above 15% considered by Houde and Schekter (1981) as the minimum growth rate for marine fish larvae. Group A3 showed a lower growth for very different reasons. Werner and Blaxter (1980, 1981) reported lower growth rate of herring larvae if prey density was under or above a certain threshold. Larvae feeding at high prey densities evacuated their guts more rapidly than those feeding at low prey density and digested the food less efficiently, passing the *Artemia* nauplii through the gut practically intact. This might be the case of group A3 larvae (personal observation, 2003), prey might not be thoroughly digested and assimilated. As has been observed in other marine fish larvae, the rate of survival and growth increases in parallel to prey density only up to a certain point. At prey densities above this prey density threshold, increases in the number of available prey do not result in a concomitant increase in survival, growth or food consumption.

Prey concentration and its consumption affects growth rate and the animal's energy cost in obtaining food and, consequently, the duration of the larval period (Laurence 1977; Houde and Shekter 1981). In this respect, metamorphosis of Senegal sole, measured according to the position of the left eye, was delayed in the fish of group R throughout the sampling period and especially at

day 20. At 20 dph the larvae from groups R and A3 showed all the four stages of eye migration described by Fernández-Díaz et al. (2001), whereas those from groups A and A2 were in more advanced stages (3, 4 and 5). This delay was maintained until the end of the study in the group R. According to Fernández-Díaz et al. (2001) in a study carried out at similar rearing conditions as those used in the present work, age and total length of the fish when 50% of the population started eye migration varied between 9.4–15.17 days and 5.58–5.90 mm, respectively, depending on the feeding regime. In the present study, eye migration started later (13.16–16.06 days) at about the same length (5.23–5.75 mm). On the other hand, Fernández-Díaz et al. (2001) observed that 95% of the larvae ended eye migration after 6.97–28.74 days, whereas in the present study the duration of eye migration lasted only 6.83–7.9 days, with groups A (6.83 days) and A2 (6.95 days) being the fastest.

There is a clear dietary influence on flatfish metamorphosis. Hamre et al. (2002), in a multidisciplinary work on halibut metamorphosis, found that eye migration and pigmentation of the larvae were affected by the prey administered and/or the composition of the prey. Ossification and correct asymmetrical development of the cranium with subsequent eye migration were significantly better in zooplankton-fed larvae vs. *Artemia*-fed larvae (Saele et al. 2003). No significant differences were found in survival or growth until day 46, although *Artemia*-fed larvae showed a growth depression after day 45 probably caused by the small size of the prey not being able to cover the energy requirements of the larvae (Hamre et al. 2002). The eye migration of *Artemia*-fed larvae was delayed by 35 days compared to zooplankton-fed larvae (Solbakken et al. 2002). On the other hand, Gara et al. (1998) did not find differences in growth and metamorphosis in halibut larvae fed with the same feeding regime (*Artemia* nauplii) and different enrichment strategies. These authors found a clear relationship between the eye migration index and the growth rate of the larvae. The same could also be established for Senegal sole (Fernández-Díaz et al. 2001, present work). Although there are not enough data for other flatfish species (common sole, Amara and Lagardère 1995; winter flounder, Chambers and Leggett 1987; starry flounder, Policansky 1982), we consider that for future studies on flatfish metamorphosis, eye migration or metamorphosis stage should be related to growth and/or size rather than age of the fish. Sub-optimal feeding of the larvae, due to inadequate size, density or nutritional deficiency of the live prey, causes retardation in eye migration and metamorphosis.

For industrial purposes, enriched *Artemia* metanauplii can be used from start feeding in Senegal sole larvae in order to provide acceptable results of growth and survival. However, for nutritional studies the problems encountered in enriching the metanauplii with the adequate amounts of DHA, HUFA or phospholipids must be considered and rotifers should be provided. Rotifers, in contrast to *Artemia* metanauplii, can accumulate essential fatty acids and phospholipids providing compositions similar to copepods, the natural larval prey in the wild environment (Bell et al. 2003).



## Acknowledgements

Thanks are due to J.P. Cañavate for providing the sole eggs used in this study. This study was undertaken with the support of Jacumar (Spanish Ministry of Agriculture, Fisheries and Food) and Generalitat de Catalunya. M. Villalta also acknowledges the support of a grant from Department of Universities, Science and Research (DURSI) of Catalonia and Universidad Autónoma de Barcelona. Thanks are also due to J. Canoura, G. Maciá and M. Monllaó for their help in live food and larval rearing.

## References

- Amara R. and Lagardère F. 1995. Taille et âge au début de la métamorphose chez la sole (*Solea solea* (L.)) du golfe de Gascogne. ICES J. Mar. Sci. 52: 247–256.
- Bell J.G., McEvoy L.A., Estévez A., Shields R.J. and Sargent J.R. 2003. Optimising lipid nutrition in first-feeding flatfish larvae. Aquaculture 227: 211–220.
- Cañavate J.P. and Fernández-Díaz C. 1999. Influence of co-feeding larvae with live and inert diets on weaning the sole *Solea senegalensis* onto commercial dry feeds. Aquaculture 174: 255–263.
- Carbó R., Estevez A. and Furones M.D. 2002. Intelligent and multifunctional recirculation system. Its application in research at CA-IRTA. Eur. Aquacult. Soc. Special Publication 32: 171–172.
- Chambers R.C. and Leggett W.C. 1987. Size and age at metamorphosis in marine fishes: an analysis of laboratory-reared winter flounder (*Pseudopleuronectes americanus*) with a review of variation in other species. Can. J. Fish. Aquat. Sci. 44: 1936–1947.
- Dinis M.T. 1992. Aspects of the potential of *Solea senegalensis* for aquaculture: larval rearing and weaning to an artificial diet. Aquacult. Fish. Manage. 23: 515–520.
- Dinis M.T., Ribeiro L., Conceição L.E.M. and Aragao C. 2000. Larvae digestion and new weaning experiments in *Solea senegalensis*. Cahiers Options Méditerranéennes. 47: 193–204.
- Dinis M.T., Ribeiro L., Soares F. and Sarasquete C. 1999. A review on the cultivation potential of *Solea senegalensis* in Spain and in Portugal. Aquaculture 176: 27–38.
- Drake P., Arias A.M. and Rodríguez R.B. 1984. Cultivo extensivo de peces marinos en los esteros de las salinas de San Fernando (Cádiz) II. Características de la producción de peces. Informes Técnicos Instituto de Investigaciones Pesqueras 116, 23pp.
- Fernández-Díaz C., Yúfera M., Cañavate J.P., Moyano F.J., Alarcón F.J. and Díaz M. 2001. Growth and physiological changes during metamorphosis of Senegal sole reared in the laboratory. J. Fish Biol. 58: 1086–1097.
- Gara B., Shields R.J. and McEvoy L. 1998. Feeding strategies to achieve correct metamorphosis of Atlantic halibut, *Hippoglossus hippoglossus* L., using enriched *Artemia*. Aquacult. Res. 29: 935–948.
- Hamre K., Opstad I., Espe M., Solbakken J., Hemre G.-I. and Pittman K. 2002. Nutrient composition and metamorphosis success of Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*, L.) larvae fed natural zooplankton or *Artemia*. Aquacult. Nutr. 8: 139–148.
- Houde E.D. and Schekter R.C. 1981. Growth rates, rations and cohort consumption of marine fish larvae in relation to prey concentrations. Rapports du Conseil International pour l'Exploration de la Mer 178: 441–453.
- Howell B.R. 1997. A re-appraisal of the potential of the sole, *Solea solea* (L.), for commercial cultivation. Aquaculture 155: 355–365.
- Laurence G.C. 1977. A bioenergetic model for the analysis of feeding and survival potential of winter flounder, *Pseudopleuronectes americanus*, larvae during the period from hatching to metamorphosis. Fish. Bull. 75: 529–546.

- Marín-Magán V., Anguís V. and Cañavate J.P. 1995. Selective feeding and prediction of food consumption in sole larvae *Solea senegalensis* reared on the rotifer *Brachionus plicatilis* and *Artemia* nauplii. Eur. Aquacult. Soc. Especial Publication. 24: 443–447.
- Marmulla G. and Rösch R. 1990. Maximum daily ration of juvenile fish fed on living natural zooplankton. J. Fish Biol. 36: 789–801.
- Martínez I., Moyano F.J., Fernández-Díaz C. and Yúfera M. 1999. Digestive enzyme activity during larval development of the Senegal sole (*Solea senegalensis*). Fish Physiol. Biochem. 21: 317–323.
- Policansky D. 1982. Influence of age, size, and temperature on metamorphosis in the starry flounder, *Platichthys stellatus*. Can. J. Fish. Aquat. Sci. 39: 514–517.
- Reitan K.I., Rainuzzo J.R., Oeie G. and Olsen Y. 1997. A review on the nutritional effects of algae in marine fish larvae. Aquaculture 155: 211–225.
- Saele O., Solbakken J.S., Watanabe K., Hamre K. and Pittman K. 2003. The effect of diet on ossification and eye migration in Atlantic halibut larvae. Aquaculture 220: 683–696.
- Solbakken J.S., Berntssen M.H.G., Norberg B., Pittman K. and Hamre K. 2002. Different iodine and thyroid hormone levels between Atlantic halibut larvae fed wild zooplankton or *Artemia* from first exogenous feeding until post metamorphosis. J. Fish Biol. 61: 1345–1362.
- Werner R.G. and Blaxter J.H.S. 1980. Growth and survival of larval herring (*Clupea harengus*) in relation to prey density. Can. J. Fish. Aquat. Sci. 37: 1063–1069.
- Werner R.G. and Blaxter J.H.S. 1981. The effect of prey density on mortality, growth and food consumption in larval herring (*Clupea harengus* L.). Rapports du Conseil international pour la Exploration de la Mer 178: 405–408.
- Yasunaga Y. 1971. Studies on the feeding habit and growth of the plaice, *Paralichthys olivaceus*, in the larval stage. Bull. Tokai Regional Fish. Res. Lab. 68: 31–43.
- Yoshimatsu T. and Kitajima C. 1996. Effects of daily ration and feeding frequency of *Artemia* on the growth of mullet larvae. Aquacult. Int. 4: 85–88.
- Yúfera M. 1982. Aislamiento, caracterización y puesta en cultivo de una cepa de pequeño tamaño de *Brachionus plicatilis* O.F. Muller (1786). Ph.D. Thesis. Univ. Sevilla – Facultad de Biología, Sevilla, Spain, 162pp.
- Yúfera M., Pascual E. and Fernández-Díaz C. 1999. A highly efficient microencapsulated food for rearing early larvae of marine fish. Aquaculture 177: 249–256.



## Arachidonic acid enriched live prey induces albinism in Senegal sole (*Solea senegalensis*) larvae

Mireia Villalta<sup>a</sup>, Alicia Estévez<sup>a,\*</sup>, Matthew P. Bransden<sup>b</sup>

<sup>a</sup>Centro de Acuicultura-IRTA and Centro de Referencia en Acuicultura, Generalitat de Catalunya, Cir. Poble Nou Km 6, 43540 San Carlos de la Ràpita, Tarragona, Spain

<sup>b</sup>Marine Research Laboratories, Tasmania Aquaculture and Fisheries Institute and Aquafin Cooperative Research Centre (CRC), University of Tasmania, Hobart, Tasmania 7001, Australia

Received 17 September 2004; received in revised form 22 November 2004; accepted 22 November 2004

### Abstract

We examined the effect of dietary arachidonic acid (20:4n-6, ARA) on growth, survival, pigmentation and fatty acid composition of Senegal sole larvae using a dose–response design. From 3 to 37 days post-hatch (dph), larvae were fed live food (rotifers from 3 to 9 dph, *Artemia* nauplii from ~37 dph) that had been enriched using one of three experimental emulsions containing 3 graduated concentrations (1.3, 68 and 120.1 mg ARA g<sup>-1</sup> dry weight) of ARA and constant docosahexaenoic acid (22:6n-3, DHA). A commercial enrichment product (DHA-Protein Selco, ARA content 7.8 mg g<sup>-1</sup> dry weight) was used as a reference diet. Final concentration of ARA in *Artemia* nauplii ranged from 0.2 to 17.5 mg g<sup>-1</sup> lipids. Growth and survival were independent of dietary levels of ARA tested. However, there was a correlation between dietary ARA and a significant reduction in pigmentation leading to increased albinism. Tissue fatty acid concentrations reflected the corresponding dietary composition. Eicosapentaenoic acid (20:5n-3, EPA) levels in all the tissues examined were inversely related to dietary ARA. There was almost a 100-fold increase in the proportion of docosapentaenoic acid (22:5n-3, DPA) in the tissues relative to the diet, which might indicate chain elongation from EPA as a result of inadequate dietary DHA. A negative, linear correlation was found between the pigmentation rate and the ARA content in the head, as well as with dietary ARA/EPA ratio.

© 2004 Elsevier B.V. All rights reserved.

**Keywords:** Arachidonic acid; Albinism; Pigmentation; Fatty acid; Larvae; *Solea senegalensis*; Enrichment; Live food

### 1. Introduction

The Senegal sole is a flatfish found along the Mediterranean and South Atlantic coasts, and is a

prime candidate for aquaculture in these areas (Dinis et al., 1999). The rearing of sole in Spain and Portugal began in the early 1980s using techniques employed in the culture of other commercial marine fish larvae (Dinis, 1986, 1992; Drake et al., 1984; Rodríguez, 1984), while the on-growing of the species was carried out extensively in sea water ponds. The rearing methods for Senegal sole have been documented

\* Corresponding author. Tel.: +34 977745427; fax: +34 977744138.

E-mail address: alicia.estevez@irta.es (A. Estévez).

(Dinis et al., 1999), although high mortalities during the weaning phase due to inadequate nutrition and pathological problems (Padrós et al., 2003; Zarza et al., 2003), as well as problems of malpigmentation (Soares et al., 2001), are still substantial challenges to the successful culture of this species.

Although the mass production of juveniles occurs in Spain and Portugal, determination of the nutritional requirements of the larvae remains incomplete. Recent nutrition-related research has concentrated on weaning problems (Cañavate and Fernandez-Diaz, 1999; Day et al., 1999; Dinis et al., 2000; Engrola et al., 2001; Ribeiro et al., 2003) or on the amino acid requirements of larvae (Morris et al., 2004) and post larvae (Rønnestad et al., 2000, 2001; Aragao et al., 2004). Despite the importance of the essential fatty acids (EFA), ARA, EPA and DHA, in diets for marine fish larvae, no information exists on the requirements of these EFA in Senegal sole larvae. First-feeding Senegal sole larvae are briefly fed on rotifers (from 3 to 9 dph), followed by *Artemia* nauplii, or directly on *Artemia* from first feed (Villalta and Estévez, unpublished data). These live feeds are naturally deficient in EFA (Sargent et al., 1999), so it is necessary for the feeds to be enriched, either with algae, oil emulsions or other preparations rich in EFA and other essential nutrients. According to Dinis et al. (1999), different enrichment regimes in live feeds failed to demonstrate any clear effect of polyunsaturated fatty acids (PUFA) on larval growth or survival. Nevertheless, an adequate supply of essential PUFA during the early life stages may still affect growth and survival during later stages of development (Howell et al., 1995). Furthermore, Senegal sole, like all flatfish, undergo metamorphosis, with a transition from an upright swimming behaviour to the "flat" fish morphology of an adult. Migration of the eye also occurs at this time. The provision of adequate nutrition during major physiological events such as metamorphosis is particularly critical (Dhert et al., 1990). Estévez and Kanazawa (1995) reported that dietary EFA deficiency causes incomplete metamorphosis in other flatfish.

Despite the extensive research into larval requirement for n-3 PUFA, only recent consideration has been given to n-6 PUFA, in particular ARA. ARA is generally conserved during periods of starvation in

marine fishes (see review by Izquierdo, 1996), including Senegal sole (Mourete and Vazquez, 1996), and serves as the preferred precursor for eicosanoid biosynthesis (Bell et al., 1994). High ARA levels, however, have been implicated in the malpigmentation of various flatfish species (McEvoy et al., 1998a; Estévez et al., 1999; Copeman et al., 2002; Bell et al., 2003). Malpigmentation is a major problem in the culture of many flatfish and dramatically reduces its marketability (Venizelos and Benetti, 1999). Thus, this study was designed to investigate the role of dietary ARA on growth, survival and pigmentation of Senegal sole larvae from 3 to 37 days post hatch (dph) using a dose-response design. In addition, a further aim of this study was to identify correlations between fatty acids in the head, gut and whole carcass with those found in the diet to determine whether particular fatty acids are being preferentially retained or utilised.

## 2. Material and methods

### 2.1. Experimental emulsions

Commercially available DHA and ARA oils obtained, respectively, from the heterotrophically grown algae *Cryptocodinium cohnii* (Neuromins<sup>®</sup>, Martek Bioscience, USA) and fungus *Mortierella alpina* (Vevodar<sup>®</sup>, DSM Food Specialties, Netherlands) were used. Vevodar<sup>®</sup> oil gradually replaced olive oil to produce emulsions with "low" (ARA-L), "medium" (ARA-M) or "high" (ARA-H) ARA contents. The components used in the formulation of each emulsion and the selected fatty acid composition is shown in Table 1. Oil mixtures were emulsified with equal amounts of distilled water by homogenising with an Ultra-turrax T25 at high speed for 60 s. The emulsion was then transferred to plastic syringes, the air removed, the syringes cooled in ice and kept in a refrigerator (4 °C), in an upright position. A commercial emulsion (DHA-Protein Selco, INVE) was used as a reference diet.

### 2.2. Live food enrichment

Rotifers were enriched in 10 l containers at a density of 500 rotifers ml<sup>-1</sup> for 12 h at 20 °C using

Table 1  
Formulation and fatty acid composition (% TFA) of the commercial emulsion, DHA-Protein Selco, and the experimental emulsions (mean  $\pm$  SD, n=3)

	DHA-Protein Selco	ARA-L	ARA-M	ARA-H
<i>Formulation (mg g<sup>-1</sup>)</i>				
Vevodar® oil <sup>a</sup>		0	150	300
Vegetable oil <sup>b</sup>		35	18	0
Olive oil		355	222	90
Neuromins® oil <sup>c</sup>		500	500	500
Supplements <sup>d</sup>		110	110	110
DHA-Protein Selco	1000			
Total FA mg g <sup>-1</sup> DW	100.9 $\pm$ 15.3	283.3 $\pm$ 24.8	331.07 $\pm$ 35.1	265.3 $\pm$ 31.0
<i>Fatty acids</i>				
14:0	2.0 $\pm$ 0.1	7.9 $\pm$ 0.5	8.5 $\pm$ 0.5	8.5 $\pm$ 0.5
16:0	30.8 $\pm$ 0.3	14.9 $\pm$ 0.2	15.7 $\pm$ 0.2	15.6 $\pm$ 0.2
18:0	6.0 $\pm$ 0.1	1.8 $\pm$ 0.1	3.0 $\pm$ 0.1	4.1 $\pm$ 0.1
Total saturated	43.7 $\pm$ 1.0	24.9 $\pm$ 2.3	27.5 $\pm$ 1.1	28.9 $\pm$ 0.9
16:1n-7	9.4 $\pm$ 0.3	1.6 $\pm$ 0.0	1.4 $\pm$ 0.0	1.2 $\pm$ 0.1
18:1n-9	13.1 $\pm$ 0.2	46.7 $\pm$ 0.2	36.4 $\pm$ 0.1	24.7 $\pm$ 0.0
20:1n-9	1.1 $\pm$ 0.0	0.2 $\pm$ 0.0	0.2 $\pm$ 0.1	0.2 $\pm$ 0.0
Total monounsaturated	24.3 $\pm$ 0.2	49.5 $\pm$ 0.5	38.8 $\pm$ 1.2	28.6 $\pm$ 0.9
18:2n-6	8.8 $\pm$ 0.5	4.4 $\pm$ 0.2	4.1 $\pm$ 0.1	3.9 $\pm$ 0.2
20:2n-6	0.0	0.0	0.5 $\pm$ 0.0	0.2 $\pm$ 0.0
20:3n-6	0.0	0.4 $\pm$ 0.0	0.6 $\pm$ 0.0	1.1 $\pm$ 0.0
20:4n-6	0.9 $\pm$ 0.1	0.2 $\pm$ 0.0	7.9 $\pm$ 0.2	14.8 $\pm$ 0.2
Total n-6 PUFA	10.3 $\pm$ 0.5	4.6 $\pm$ 0.2	13.6 $\pm$ 0.1	21.1 $\pm$ 0.2
18:3n-3	1.6 $\pm$ 0.7	0.5 $\pm$ 0.0	0.3 $\pm$ 0.0	0.1 $\pm$ 0.0
20:5n-3	4.6 $\pm$ 0.3	0.2 $\pm$ 0.0	0.4 $\pm$ 0.1	0.7 $\pm$ 0.0
22:5n-3	0.9 $\pm$ 0.0	0.1 $\pm$ 0.0	0.2 $\pm$ 0.0	0.6 $\pm$ 0.1
22:6n-3	14.7 $\pm$ 0.8	20.2 $\pm$ 0.3	19.1 $\pm$ 0.8	19.2 $\pm$ 0.7
Total n-3 PUFA	21.7 $\pm$ 0.5	21.0 $\pm$ 0.5	20.1 $\pm$ 0.7	21.5 $\pm$ 0.5
n-3/n-6	2.1 $\pm$ 0.5	4.6 $\pm$ 0.3	1.5 $\pm$ 0.2	1.0 $\pm$ 0.0
DHA/EPA	3.2 $\pm$ 0.0	101.0 $\pm$ 1.5	47.8 $\pm$ 8.0	27.4 $\pm$ 4.0
ARA/DHA	0.06 $\pm$ 0.0	0.01 $\pm$ 0.0	0.4 $\pm$ 0.0	0.8 $\pm$ 0.5
ARA/EPA	0.2 $\pm$ 0.0	1.0 $\pm$ 0.0	19.8 $\pm$ 3.5	21.1 $\pm$ 0.3

Totals include some minor components not shown.

<sup>a</sup> Vevodar® oil, DSM Foods Specialties, Delft, Netherland.

<sup>b</sup> Canola and soybean oil blend.

<sup>c</sup> Neuromins® oil, Martek Biosciences, Columbia, MD, USA.

<sup>d</sup> Supplements: Soy lecithin, 70 mg; vitamin E, 40 mg.

0.1 g l<sup>-1</sup> of all emulsions. After 12 h, the rotifers were gently washed with UV filtered seawater, rinsed for a further 1 min with freshwater to reduce bacterial loads, and subsequently fed to the larvae.

Six-hour-old *Artemia* nauplii (EG strain, INVE) were enriched in 10 l containers at 100 naupli ml<sup>-1</sup> for 18 h at 26 °C with 0.6 g l<sup>-1</sup> of the emulsions. Enriched metanauplii were thoroughly washed with UV filtered seawater and freshwater (15 min) before feeding to the larvae.

Rotifer and *Artemia* were sampled twice during the experimental period for lipid analysis.

### 2.3. Sole larviculture

Senegal sole (*Solea senegalensis*) eggs were obtained from Centro de Investigación y Cultivo de Especies Marinas (CICEM) "El Toruño" (Cádiz, Spain) from a broodstock held under natural photo and thermo periods. Fertilised eggs were transported by road to Centro de Acuicultura-Institut de Recerca i Tecnologia Agroalimentàries (CA-IRTA) and larvae hatched during transport. Once at CA-IRTA, larvae were distributed (50 larvae l<sup>-1</sup>) into twelve 35 l, 150 µm mesh baskets distributed amongst four, 1500 l

holding tanks. The tanks were connected to a recirculation unit described elsewhere (Carbó et al., 2003). Water temperature was maintained at  $19 \pm 1$  °C and salinity was 34‰. Photoperiod was maintained at 18 h light:6 h dark and mild aeration was provided. Larvae were fed on rotifers from 3 to 9 dph at a density of 10 rotifers  $\text{ml}^{-1}$  and *Artemia* nauplii from 6 until 37 dph. *Artemia* ration was adjusted to be 70% body weight (bw) from 3 to 15 dph, 20% bw from 16 to 30 dph, and 7% bw from 31 to 37 dph following the recommendations by Cañavate (personal communication, 2004) to avoid unenriched leftovers. Water changes in the holding tanks were performed daily. Live prey were distributed twice per day.

Standard length and dry weight were measured at 1, 4, 6, 10, 12, 15, 20, 30 and 37 dph. Twenty larvae were sampled, placed in beakers and euthanized using lethal concentration of 3-amino benzoate methane sulphonate (1000 mg/l, MS 222). Length was measured using a dissecting microscope and image

analyser (AnalySIS, SIS GmbH, Germany). Dry weight (DW) determination was carried out by rinsing larvae with distilled water to remove salt and then oven-drying at 60 °C for 24 h. Eye migration during sole metamorphosis was assessed according to the description of Cañavate and Fernandez-Diaz (1999). Data are presented as the relative amount of larvae at each stage of development at the same age. Eye migration index ( $I_{EM}$ ) was calculated according to Solbakken et al. (1999) considering stage 3b and 4 of Cañavate and Fernandez-Diaz (1999) as 4 and 5 in the calculation of the index.

$$I_{EM} = \Sigma(\% \text{ fish in each stage} \times \text{stage}) / 100$$

Triplicate samples were taken at 1 dph (1935 larvae) for initial biochemical analysis. Additional larvae were sampled at 15 (50 larvae  $\text{basket}^{-1}$ ) and 37 dph (20 larvae  $\text{basket}^{-1}$ , heads, guts and carcasses dissected on ice and kept separately) for lipid analysis. The samples were placed directly into chloroform/

Table 2

Fatty acid composition (% TFA) of newly hatched larvae (1 day post-hatch, 'initial') and *Artemia* nauplii enriched with commercial (DHA-Protein Selco) or experimental (ARA-L, M, H) emulsions (mean  $\pm$  SD, n=3)

	Larvae		Artemia		
	Initial	DHA-Protein Selco	ARA-L	ARA-M	ARA-H
Total lipids (mg $\text{g}^{-1}$ DW)	49.3 $\pm$ 2.5	116.3 $\pm$ 6.4 <sup>a</sup>	132.2 $\pm$ 5.4 <sup>b</sup>	142.9 $\pm$ 3.7 <sup>b</sup>	132.6 $\pm$ 5.0 <sup>b</sup>
Total FA (mg $\text{g}^{-1}$ DW)	31.7 $\pm$ 1.6	22.0 $\pm$ 6.5 <sup>a</sup>	30.0 $\pm$ 5.0 <sup>b</sup>	37.4 $\pm$ 4.8 <sup>b</sup>	28.1 $\pm$ 4.5 <sup>b</sup>
14:0	1.4 $\pm$ 0.5	0.5 $\pm$ 0.0	2.8 $\pm$ 0.2 <sup>b</sup>	2.8 $\pm$ 0.2 <sup>b</sup>	2.3 $\pm$ 0.2 <sup>b</sup>
16:0	21.8 $\pm$ 0.1	25.8 $\pm$ 0.3	12.1 $\pm$ 0.2 <sup>a</sup>	12.1 $\pm$ 0.2 <sup>a</sup>	12.9 $\pm$ 0.2 <sup>a</sup>
18:0	7.0 $\pm$ 1.7	8.4 $\pm$ 0.1 <sup>b</sup>	4.3 $\pm$ 0.1 <sup>a</sup>	4.3 $\pm$ 0.1 <sup>a</sup>	5.7 $\pm$ 0.1 <sup>a</sup>
Total saturated	31.5 $\pm$ 1.2	38.0 $\pm$ 1.0 <sup>b</sup>	20.3 $\pm$ 1.0 <sup>a</sup>	20.3 $\pm$ 1.0 <sup>a</sup>	22.1 $\pm$ 0.2 <sup>a</sup>
16:1n-7	4.3 $\pm$ 0.2	6.4 $\pm$ 0.3 <sup>b</sup>	3.5 $\pm$ 0.1 <sup>a</sup>	3.0 $\pm$ 0.1 <sup>a</sup>	3.1 $\pm$ 0.1 <sup>a</sup>
18:1n-9	8.8 $\pm$ 0.2	22.0 $\pm$ 0.2 <sup>b</sup>	43.0 $\pm$ 0.2 <sup>b</sup>	34.4 $\pm$ 0.2 <sup>b</sup>	28.2 $\pm$ 0.7 <sup>b</sup>
18:1n-7	2.9 $\pm$ 0.1	7.3 $\pm$ 0.0	5.0 $\pm$ 0.1 <sup>a</sup>	4.8 $\pm$ 0.1 <sup>a</sup>	5.4 $\pm$ 0.1 <sup>a</sup>
20:1n-11	1.1 $\pm$ 0.5	0.0	0.4 $\pm$ 0.0	0.4 $\pm$ 0.0	0.3 $\pm$ 0.1
20:1n-9	0.3 $\pm$ 0.1	0.4 $\pm$ 0.0	0.1 $\pm$ 0.2	0.1 $\pm$ 0.2	0.5 $\pm$ 0.0
Total monounsaturated	20.8 $\pm$ 1.6	38.4 $\pm$ 0.5 <sup>a</sup>	53.9 $\pm$ 1.5 <sup>c</sup>	43.9 $\pm$ 2.3 <sup>b</sup>	38.3 $\pm$ 0.5 <sup>a</sup>
18:2n-6	0.9 $\pm$ 0.0	9.0 $\pm$ 0.5 <sup>b</sup>	7.2 $\pm$ 0.3 <sup>a,b</sup>	6.9 $\pm$ 0.4 <sup>a,b</sup>	6.5 $\pm$ 0.1 <sup>a</sup>
20:2n-6	0.2 $\pm$ 0.1	0.0	0.0	0.0	0.3 $\pm$ 0.1
20:3n-6	0.0	0.0	0.3 $\pm$ 0.0	0.3 $\pm$ 0.0	0.6 $\pm$ 0.2
20:4n-6	2.9 $\pm$ 0.0	0.2 $\pm$ 0.1 <sup>a</sup>	0.1 $\pm$ 0.0 <sup>a</sup>	4.5 $\pm$ 0.3 <sup>b</sup>	8.3 $\pm$ 0.5 <sup>c</sup>
Total n-6 PUFA	5.2 $\pm$ 0.5	9.4 $\pm$ 0.3 <sup>a</sup>	7.6 $\pm$ 0.1 <sup>a</sup>	11.7 $\pm$ 0.4 <sup>b</sup>	16.3 $\pm$ 0.6 <sup>c</sup>
18:3n-3	0.3 $\pm$ 0.0	4.1 $\pm$ 0.3 <sup>a</sup>	12.5 $\pm$ 1.1 <sup>b</sup>	11.8 $\pm$ 1.8 <sup>b</sup>	13.6 $\pm$ 0.5 <sup>b</sup>
20:5n-3	3.9 $\pm$ 0.8	1.8 $\pm$ 0.1	1.5 $\pm$ 0.1	1.5 $\pm$ 0.0	1.4 $\pm$ 0.2
22:5n-3	4.1 $\pm$ 0.6	0.3 $\pm$ 0.0	0.2 $\pm$ 0.0	0.2 $\pm$ 0.0	0.1 $\pm$ 0.0
22:6n-3	24.2 $\pm$ 3.4	6.8 $\pm$ 0.1	6.8 $\pm$ 0.5	8.9 $\pm$ 1.3	6.6 $\pm$ 1.2
Total n-3 PUFA	39.2 $\pm$ 1.6	14.2 $\pm$ 0.3 <sup>a</sup>	22.8 $\pm$ 1.5 <sup>b</sup>	24.1 $\pm$ 0.2 <sup>b</sup>	23.3 $\pm$ 0.5 <sup>b</sup>
DHA/EPA	6.1 $\pm$ 0.2	3.8 $\pm$ 0.2	4.5 $\pm$ 0.1	5.9 $\pm$ 0.9	4.8 $\pm$ 0.1
ARA/DHA	0.1 $\pm$ 0.0	0.04 $\pm$ 0.0 <sup>b</sup>	0.01 $\pm$ 0.0 <sup>a</sup>	0.5 $\pm$ 0.3 <sup>c</sup>	1.3 $\pm$ 0.2 <sup>d</sup>
ARA/EPA	0.7 $\pm$ 0.1	0.1 $\pm$ 0.0 <sup>b</sup>	0.07 $\pm$ 0.03 <sup>a</sup>	3.0 $\pm$ 0.2 <sup>c</sup>	6.0 $\pm$ 0.5 <sup>d</sup>

Totals include some minor components not shown. Superscripts (a, b, c, d) denote significant differences among diets ( $P < 0.05$ ,  $F_{3,11}$ ).

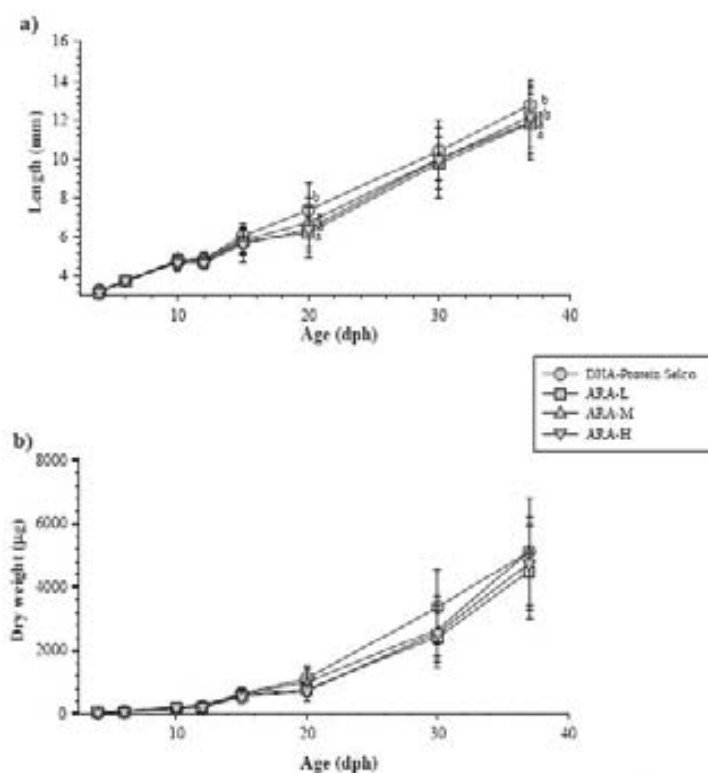


Fig. 1. Temporal changes in length and weight of Senegal sole larvae fed *Artemia* enriched on commercial (DHA-Protein Selco) or experimental (ARA-L, -M, -H) emulsions (mean  $\pm$  SD,  $n=3$ ). Different superscripts denote a significant difference ( $P<0.05$ ) among dietary treatment at that age.

methanol (2:1, v/v) and stored under nitrogen at  $-20^{\circ}\text{C}$  until analysis.

Survival and pigmentation success were determined at the end of the experiment by counting and assessing all the remaining larvae. Abnormally pigmented individuals (totally or partially malpigmented) were considered as a whole group without giving any category or pigmentation index due to the inconveniences of such classifications (Bolker and Hill, 2000). No ambicolored (both sides pigmented) fish were detected.

#### 2.4. Lipid analysis

Total lipids from enriched live food and larval tissues were extracted in chloroform/methanol (2:1, v/v) using the method of Folch et al. (1957), and

Table 3

Growth, survival and pigmentation of Senegal sole larvae after 37 days of being fed *Artemia* enriched on commercial (DHA-Protein Selco) or experimental (ARA-L, M, H) emulsions (mean  $\pm$  SD,  $n=3$ )

	DHA-Protein Selco	ARA-L	ARA-M	ARA-H
Final length (mm)	12.8 $\pm$ 1.2 <sup>b</sup>	11.8 $\pm$ 1.6 <sup>a</sup>	11.9 $\pm$ 1.9 <sup>a</sup>	12.2 $\pm$ 1.5 <sup>b</sup>
Final weight (mg)	5.1 $\pm$ 0.8	4.5 $\pm$ 1.5	5.1 $\pm$ 1.7	4.8 $\pm$ 1.5
Survival (%)	48.9 $\pm$ 4.8	44.4 $\pm$ 18.4	58.9 $\pm$ 16.7	54.9 $\pm$ 5.7
Pigmentation (%)	99.8 $\pm$ 0.1 <sup>c</sup>	99.7 $\pm$ 0.4 <sup>c</sup>	38.9 $\pm$ 12.1 <sup>a</sup>	15.8 $\pm$ 7.1 <sup>a</sup>

Superscripts (a, b, c) denote significant differences among groups ( $P<0.05$ ,  $F_{3,264}$  for length,  $F_{3,70}$  for DW and  $F_{3,11}$  for survival and pigmentation).

quantified gravimetrically after evaporation of the solvent under a stream of nitrogen followed by vacuum desiccation overnight. Total lipids were stored in chloroform:methanol (2:1, 20 mg ml<sup>-1</sup>)

with 0.01% butylated hydroxytoluene (BHT) at -20 °C until final analysis.

Acid catalysed transmethylation was carried out using the method of Christie (1982). Methyl esters

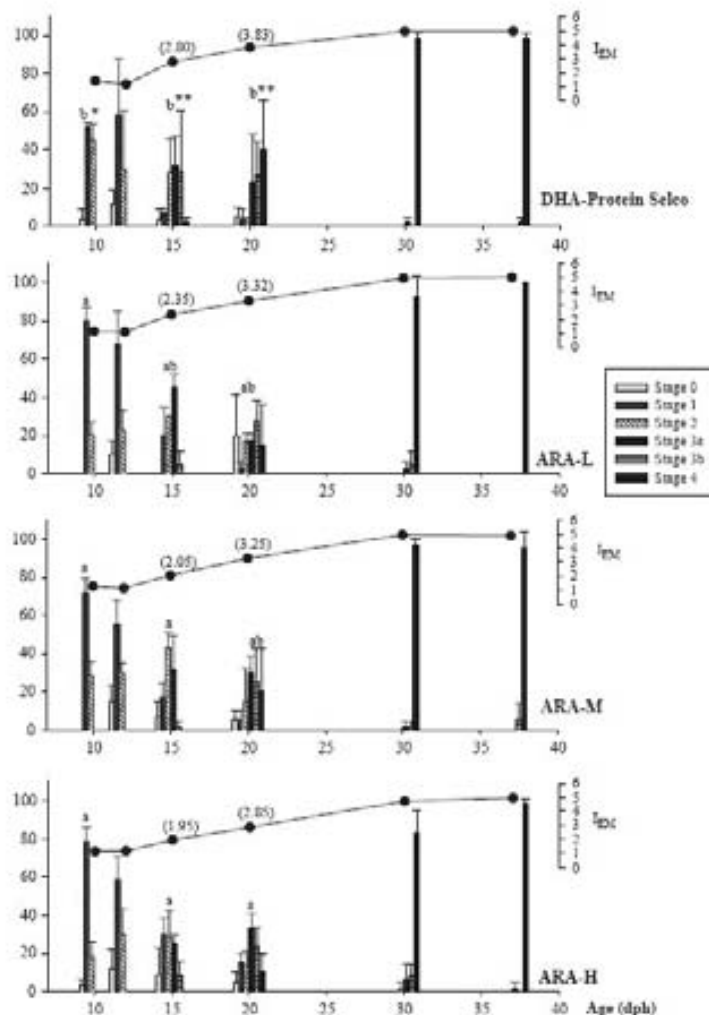


Fig. 2. Changes in eye migration of Senegal sole larvae (stages as in Cahavate and Fernandez-Diaz, 1999) fed *Artemia* enriched on commercial (DHA-Protein Selco) or experimental (ARA-L, -M, -H) emulsions. Vertical bars show the percentage  $\pm$  SD of fish at each stage of development. Different superscripts denote significant differences (\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.001$ ) among dietary treatments at the same age. Eye migration index ( $I_{EM}$ ) is shown as a line plot above each vertical bar chart  $I_{EM}$  values in parentheses are provided where significant differences ( $P < 0.001$ ) were recorded between dietary treatments at that age.



were extracted twice using isohexane:diethyl ether (1:1, v/v), purified on TLC plates and analysed by gas–liquid chromatography on a Thermo TraceGC instrument fitted with a BPX70 capillary column (30 m×0.25 mm id, SGE), using a two-stage thermal gradient from 50 °C (injection temperature) to 150 °C after ramping at 40 °C min<sup>-1</sup> and holding at 250 °C after ramping at 2 °C min<sup>-1</sup>, hydrogen (1.2 ml min<sup>-1</sup> constant flow rate) as the carrier gas, on-column injection and flame ionisation detection. Peaks were identified by comparison with known standards (Supelco, Madrid) and a well characterised fish oil, and quantified by means of the response factor to the internal standard, 21:0 fatty acid, added prior to transmethylation, using a Chrompack program (Thermo Finnigan).

### 2.5. Statistics

The variance of the data is given as standard deviation (SD) of the mean of three replicates with

differences tested for statistical significance ( $P \leq 0.05$ ) by one-way ANOVA followed by a pair-wise multiple comparison of means using Tukey's test. Prior to statistical analysis percentage data were arcsin transformed (Sokal and Rohlf, 1995). Linear and polynomial regression analysis were used to identify the relationships between diet and larval parameters. A Statgraphics package (Microsoft) was used for all statistical analysis.

## 3. Results

### 3.1. Lipid composition of live prey

Fatty acid profiles of initial larvae (1 dph) and *Artemia* enriched on the different emulsions are provided in Table 2. The composition of the rotifers is not shown due to the short time of rotifer feeding (only 6 days). No significant differences were found in the total lipid content of the nauplii enriched on the

**Table 4**  
Fatty acid composition (% TFA) of the head (including brain and eyes) of Senegal sole larvae after 37 days of being fed *Artemia* enriched on commercial (DHA-Protein Selco) or experimental (ARA-L, M, H) emulsions (mean±SD, n=3)

	DHA-Protein Selco	ARA-L	ARA-M	ARA-H
Total lipids mg g <sup>-1</sup> DW	60.5±15.6	71.3±17.5	71.6±2.0	62.8±5.9
Total FA mg g <sup>-1</sup> DW	36.1±3.4	43.9±12.2	39.9±5.5	32.2±2.9
14:0	0.7±0.1	1.3±0.1	1.1±0.1	1.2±0.2
16:0	15.5±0.9	14.8±1.6	14.9±1.5	15.1±1.6
18:0	8.9±0.5	7.8±1.2	8.6±0.6	8.9±0.9
Total saturated	26.7±1.3	25.2±2.9	26.1±2.3	26.8±2.9
16:1n-7	3.3±0.3	0.3±0.1	1.6±1.4	1.0±0.9
18:1n-9	19.2±0.3 <sup>ab</sup>	23.0±1.4 <sup>b</sup>	20.34±1.6 <sup>ab</sup>	18.0±1.7 <sup>a</sup>
18:1n-7	6.8±0.1	6.1±0.4	5.4±0.5	5.3±0.4
20:1n-11	0.4±0.1	0.1±0.1	0.5±0.1	0.4±0.0
20:1n-9	0.4±0.1	0.1±0.1	0.2±0.0	0.1±0.1
Total monounsaturated	32.1±1.7 <sup>ab</sup>	34.6±1.4 <sup>ab</sup>	36.9±2.5 <sup>b</sup>	29.5±1.6 <sup>a</sup>
18:2n-6	5.3±0.6	5.6±0.2	4.4±0.2	4.5±0.2
20:2n-6	0.2±0.0	0.2±0.0	0.2±0.0	0.2±0.0
20:3n-6	0.2±0.0	0.2±0.0	0.2±0.0	0.4±0.0
20:4n-6	3.6±0.5 <sup>a</sup>	2.8±0.5 <sup>a</sup>	5.6±0.1 <sup>b</sup>	7.9±0.5 <sup>c</sup>
Total n-6 PUFA	10.8±1.4 <sup>a</sup>	9.0±0.7 <sup>a</sup>	11.2±0.1 <sup>a</sup>	14.7±0.5 <sup>b</sup>
18:3n-3	7.4±0.5	9.1±2.7	6.1±0.0	7.3±0.9
20:5n-3	3.6±0.3 <sup>b</sup>	2.5±0.3 <sup>a</sup>	1.6±0.1 <sup>a</sup>	1.8±0.3 <sup>a</sup>
22:5n-3	4.3±0.5 <sup>b</sup>	2.8±0.2 <sup>a</sup>	2.4±0.1 <sup>a</sup>	2.7±0.5 <sup>a</sup>
22:6n-3	13.0±0.4	14.7±1.1	16.1±1.9	15.4±1.4
Total n-3 PUFA	30.3±1.8	31.1±3.7	27.7±2.0	29.0±3.1
DHA/EPA	3.6±0.2 <sup>a</sup>	5.9±0.7 <sup>b</sup>	10.0±0.9 <sup>c</sup>	8.7±0.7 <sup>b</sup>
ARA/DHA	0.3±0.03 <sup>ab</sup>	0.2±0.03 <sup>a</sup>	0.4±0.05 <sup>b</sup>	0.5±0.06 <sup>b</sup>
ARA/EPA	1.0±0.1 <sup>a</sup>	1.1±0.05 <sup>a</sup>	3.5±0.1 <sup>b</sup>	4.5±0.6 <sup>b</sup>

Totals include some minor components not shown. Superscripts (a, b, c) denote significant differences ( $P < 0.05$ ,  $F_{3,11}$ ).

experimental emulsions, although nauplii enriched with DHA-Protein Selco had significantly lower total lipid content compared to those enriched on the experimental emulsions. No significant differences were recorded in the content of saturated fatty acids (SFA) and n-3 PUFA in experimentally enriched nauplii. Significant differences were found in the proportions of monounsaturated (MUFA) and n-6 PUFA in experimentally enriched nauplii due to the differences in 18:1n-9 and ARA, reflecting the composition of the emulsion. The experimental emulsions with graduated ARA resulted in increasing proportions of ARA with similar levels of DHA and EPA. DHA-Protein Selco enriched nauplii had significantly higher levels (38%) of SFA, and lower levels of MUFA and n-3 PUFA (14%, due to a lower content in 18:3n-3) than the experimental groups. The ratios of ARA/DHA and ARA/EPA in the nauplii varied significantly between groups, being the highest in ARA-H group (1.3 and 6.0, respectively) and the lowest in ARA-L group (0.01 and 0.07, respectively).

The DHA/EPA ratio did not show any significant difference among the groups.

### 3.2. Rearing success

Larvae fed DHA-Protein Selco-enriched Artemia were significantly longer ( $P < 0.0001$ ,  $F_{3, 1759}$ , Fig. 1a) than larvae fed the experimental diets at 20 dph, and significantly longer compared to larvae fed ARA-M and ARA-H at 37 dph (Fig. 1a, Table 3). Dry weight was not significantly affected ( $P = 0.267$ ,  $F_{3, 189}$ ) by any dietary treatment at any time of the experiment (Fig. 1b). Survival was not significantly affected by any diet ( $P = 0.699$ ,  $F_{3, 11}$ , Table 3), with an average survival of approximately 50% recorded for all groups. Significant differences ( $P < 0.05$ ) in the stage of metamorphosis were found between 15 and 20 dph, with DHA-Protein Selco fed larvae having more advanced stages of eye migration ( $I_{EM}$  2.8 and 3.83 at 15 and 20 dph, respectively) than larvae fed the experimental ARA treatments (Fig. 2). Increasing

Table 5  
Fatty acid composition (% TFA) of the gut (including the liver) of Senegal sole larvae after 37 days of being fed Artemia enriched on commercial (DHA-Protein Selco) or experimental (ARA-L, M, H) emulsions (mean  $\pm$  SD,  $n = 3$ )

	DHA-Protein Selco	ARA-L	ARA-M	ARA-H
Total lipids (mg g <sup>-1</sup> DW)	76.7 $\pm$ 19.5 <sup>a</sup>	118.6 $\pm$ 15.6 <sup>b</sup>	116.5 $\pm$ 13.4 <sup>b</sup>	70.9 $\pm$ 18.1 <sup>a</sup>
Total FA (mg g <sup>-1</sup> DW)	34.3 $\pm$ 5.0 <sup>a</sup>	74.5 $\pm$ 9.1 <sup>b</sup>	50.39 $\pm$ 12.6 <sup>b</sup>	37.6 $\pm$ 3.8 <sup>a</sup>
14:0	0.8 $\pm$ 0.2 <sup>a</sup>	1.8 $\pm$ 0.1 <sup>b</sup>	1.8 $\pm$ 0.5 <sup>a,b</sup>	1.7 $\pm$ 0.2 <sup>a,b</sup>
16:0	14.9 $\pm$ 0.8 <sup>b</sup>	12.2 $\pm$ 0.3 <sup>a</sup>	14.6 $\pm$ 1.2 <sup>a,b</sup>	13.7 $\pm$ 0.7 <sup>a,b</sup>
18:0	9.5 $\pm$ 0.2 <sup>b</sup>	6.0 $\pm$ 0.2 <sup>b</sup>	8.8 $\pm$ 1.5 <sup>b</sup>	7.7 $\pm$ 0.6 <sup>a,b</sup>
Total saturated	27.2 $\pm$ 0.9 <sup>b</sup>	21.6 $\pm$ 0.5 <sup>a</sup>	26.8 $\pm$ 2.5 <sup>b</sup>	24.8 $\pm$ 1.6 <sup>a,b</sup>
16:1n-7	2.9 $\pm$ 0.2	3.2 $\pm$ 0.2	3.0 $\pm$ 0.3	2.7 $\pm$ 0.1
18:1n-9	20.5 $\pm$ 2.6 <sup>a,b</sup>	26.3 $\pm$ 1.4 <sup>b</sup>	21.5 $\pm$ 1.9 <sup>a,b</sup>	20.3 $\pm$ 0.9 <sup>a</sup>
18:1n-7	7.6 $\pm$ 0.6	7.0 $\pm$ 0.9	10.2 $\pm$ 1.6	6.3 $\pm$ 0.3
20:1n-11	0.7 $\pm$ 0.1	0.7 $\pm$ 0.1	0.7 $\pm$ 0.1	0.5 $\pm$ 0.0
20:1n-9	0.3 $\pm$ 0.1	0.3 $\pm$ 0.1	0.2 $\pm$ 0.1	0.2 $\pm$ 0.0
Total monounsaturated	35.4 $\pm$ 2.7	41.3 $\pm$ 2.3	38.7 $\pm$ 5.5	34.9 $\pm$ 1.5
18:2n-6	5.7 $\pm$ 0.2	6.2 $\pm$ 0.3	5.3 $\pm$ 0.3	5.5 $\pm$ 0.5
20:2n-6	0.2 $\pm$ 0.0	0.2 $\pm$ 0.0	0.2 $\pm$ 0.0	0.2 $\pm$ 0.0
20:3n-6	0.2 $\pm$ 0.1	0.1 $\pm$ 0.0	0.2 $\pm$ 0.1	0.5 $\pm$ 0.0
20:4n-6	4.4 $\pm$ 0.6 <sup>b</sup>	2.3 $\pm$ 0.3 <sup>a</sup>	4.7 $\pm$ 0.5 <sup>b</sup>	9.7 $\pm$ 0.5 <sup>c</sup>
Total n-6 PUFA	12.0 $\pm$ 0.2 <sup>b</sup>	9.4 $\pm$ 0.6 <sup>a</sup>	11.3 $\pm$ 0.5 <sup>b</sup>	17.5 $\pm$ 1.2 <sup>c</sup>
18:3n-3	9.6 $\pm$ 0.8	10.8 $\pm$ 1.0	8.4 $\pm$ 1.1	9.0 $\pm$ 1.0
20:5n-3	3.1 $\pm$ 0.9	2.3 $\pm$ 0.4	2.8 $\pm$ 1.5	1.6 $\pm$ 0.3
22:5n-3	3.0 $\pm$ 0.8	2.3 $\pm$ 0.4	2.3 $\pm$ 0.9	2.0 $\pm$ 0.3
22:6n-3	8.2 $\pm$ 0.2	10.6 $\pm$ 2.0	7.8 $\pm$ 0.1	8.7 $\pm$ 1.3
Total n-3 PUFA	25.7 $\pm$ 2.7	27.8 $\pm$ 2.2	23.0 $\pm$ 3.9	22.7 $\pm$ 1.9
DHA/EPA	3.0 $\pm$ 1.1	4.6 $\pm$ 0.2	3.5 $\pm$ 1.4	5.5 $\pm$ 0.4
ARA/DHA	0.5 $\pm$ 0.07 <sup>b</sup>	0.2 $\pm$ 0.01 <sup>a</sup>	0.6 $\pm$ 0.07 <sup>a,b</sup>	1.1 $\pm$ 0.2 <sup>c</sup>
ARA/EPA	1.7 $\pm$ 0.9 <sup>a,b</sup>	1.0 $\pm$ 0.07 <sup>a</sup>	2.2 $\pm$ 1.0 <sup>a,b</sup>	6.3 $\pm$ 1.3 <sup>b</sup>

Totals include some minor components not shown. Superscripts (a, b, c) denote significant differences among groups ( $P < 0.05$ ,  $F_{3,14}$ ).

dietary ARA slowed the degree of eye migration at 15 and 20 dph, with the most advanced eye migration in the experimental diets occurring for the ARA-L treatment (2.35 and 3.32 at 15 and 20 dph, respectively), followed by ARA-M (2.05 and 3.25, respectively) while larvae fed ARA-H had the least advanced (1.95 and 2.85, respectively). Eye migration was complete and normal in all the groups at the end of the experiment.

### 3.3. Dietary effects on lipid and fatty acid composition of larval tissues

In order of relative abundance, initial larvae contained especially high proportions of DHA, 16:0, 18:1n-9, 18:0, DPA and EPA (24.2, 21.8, 8.8, 7.0, 4.1 and 3.9% total fatty acid (TFA), respectively, Table 2). Total lipid content of the head (including brain and eyes) was not affected by dietary treatments (Table 4), while the total lipid in the guts

( $P \leq 0.05$ , Table 5) was lower in both DHA-Protein Selco and ARA-H fed groups and in the carcass ( $P \leq 0.05$ , Table 6) in ARA-M fed group. Gut and carcass lipids were mostly composed of monounsaturated fatty acids (MUFA, 35–41% and 37–42% TFA, respectively, Tables 5 and 6), while the largest proportion of PUFA (39–44% TFA) was found in the lipids of the head. After 37 days of feeding, the fatty acid composition of the three larval tissues reflected the fatty acid composition of the diet used for larval rearing with most changes occurring in the proportions of MUFA and PUFA, especially in the head. Saturated fatty acids (SFA) were relatively constant and accounted for approximately 25%TFA in all the tissues examined. All three larval tissues responded to dietary ARA by exhibiting a significant ( $P \leq 0.0001$ ) increase in this fatty acid and in the total n-6 PUFA content ( $P \leq 0.05$ ). DHA proportions were highest in the head (range of 13.0–16.1% TFA) than in the other tissues, whereas EPA content in all

Table 6

Fatty acid composition (% TFA) of the carcass of Senegal sole larvae after 37 days of being fed *Artemia* enriched on commercial (DHA-Protein Selco) or experimental (ARA-L, M, H) emulsions (mean  $\pm$  SD,  $n=3$ )

	DHA-Protein Selco	ARA-L	ARA-M	ARA-H
Total lipids (mg g <sup>-1</sup> DW)	69.5 $\pm$ 5.4 <sup>b</sup>	109.2 $\pm$ 63.8 <sup>b</sup>	42.8 $\pm$ 14.7 <sup>a</sup>	60.2 $\pm$ 9.7 <sup>b</sup>
Total FA (mg g <sup>-1</sup> DW)	19.6 $\pm$ 2.8 <sup>b</sup>	26.3 $\pm$ 15.0 <sup>b</sup>	9.0 $\pm$ 3.6 <sup>a</sup>	12.1 $\pm$ 4.2 <sup>b</sup>
14:0	0.9 $\pm$ 0.3	1.0 $\pm$ 0.3	1.2 $\pm$ 0.1	1.2 $\pm$ 0.1
16:0	14.2 $\pm$ 0.4	12.2 $\pm$ 1.4	13.2 $\pm$ 1.2	13.5 $\pm$ 0.7
18:0	8.0 $\pm$ 0.5	7.6 $\pm$ 2.3	7.6 $\pm$ 1.5	7.9 $\pm$ 0.8
Total saturated	25.4 $\pm$ 1.0	22.8 $\pm$ 3.6	23.9 $\pm$ 2.9	24.7 $\pm$ 1.5
16:1n-7	4.1 $\pm$ 0.2	4.2 $\pm$ 0.9	4.1 $\pm$ 0.3	3.8 $\pm$ 0.3
18:1n-9	19.2 $\pm$ 0.1 <sup>a</sup>	23.8 $\pm$ 2.2 <sup>b</sup>	22.8 $\pm$ 1.4 <sup>ab</sup>	20.6 $\pm$ 0.9 <sup>ab</sup>
18:1n-7	7.9 $\pm$ 0.1	4.9 $\pm$ 3.2	6.9 $\pm$ 0.2	6.7 $\pm$ 0.5
20:1n-11	0.7 $\pm$ 0.1	0.4 $\pm$ 0.3	0.6 $\pm$ 0.1	0.6 $\pm$ 0.1
20:1n-9	0.2 $\pm$ 0.1	0.4 $\pm$ 0.3	0.2 $\pm$ 0.1	0.2 $\pm$ 0.0
Total monounsaturated	37.3 $\pm$ 1.2	42.3 $\pm$ 3.6	39.8 $\pm$ 2.4	37.8 $\pm$ 2.8
18:2n-6	5.9 $\pm$ 0.1	7.7 $\pm$ 1.7	5.9 $\pm$ 0.4	6.0 $\pm$ 0.2
20:2n-6	0.4 $\pm$ 0.2	1.2 $\pm$ 0.9	0.6 $\pm$ 0.7	0.2 $\pm$ 0.0
20:3n-6	0.2 $\pm$ 0.0	0.0 $\pm$ 0.0	0.2 $\pm$ 0.1	0.4 $\pm$ 0.0
20:4n-6	3.3 $\pm$ 0.1 <sup>b</sup>	1.3 $\pm$ 0.8 <sup>a</sup>	5.2 $\pm$ 0.4 <sup>c</sup>	7.6 $\pm$ 0.7 <sup>d</sup>
Total n-6 PUFA	10.8 $\pm$ 0.1 <sup>a</sup>	11.2 $\pm$ 2.1 <sup>a</sup>	12.2 $\pm$ 0.9 <sup>ab</sup>	15.3 $\pm$ 0.6 <sup>b</sup>
18:3n-3	10.2 $\pm$ 0.6	9.9 $\pm$ 3.3	9.2 $\pm$ 1.1	9.0 $\pm$ 1.3
20:5n3	4.0 $\pm$ 0.1 <sup>a</sup>	2.6 $\pm$ 0.1 <sup>b</sup>	2.2 $\pm$ 0.3 <sup>bc</sup>	1.7 $\pm$ 0.3 <sup>a</sup>
22:5n3	3.6 $\pm$ 0.1 <sup>b</sup>	2.4 $\pm$ 0.4 <sup>a</sup>	2.5 $\pm$ 0.1 <sup>a</sup>	2.3 $\pm$ 0.1 <sup>a</sup>
22:6n-3	6.9 $\pm$ 0.3	8.7 $\pm$ 1.4	8.6 $\pm$ 1.1	7.7 $\pm$ 1.2
Total n-3 PUFA	26.6 $\pm$ 0.8	25.4 $\pm$ 2.2	24.3 $\pm$ 2.7	22.3 $\pm$ 2.4
DHA/EPA	1.7 $\pm$ 0.1 <sup>a</sup>	3.3 $\pm$ 0.5 <sup>b</sup>	4.0 $\pm$ 0.3 <sup>bc</sup>	4.6 $\pm$ 0.3 <sup>c</sup>
ARA/DHA	0.5 $\pm$ 0.01 <sup>b</sup>	0.2 $\pm$ 0.1 <sup>a</sup>	0.6 $\pm$ 0.06 <sup>b</sup>	1.0 $\pm$ 0.07 <sup>a</sup>
ARA/EPA	0.8 $\pm$ 0.02 <sup>a</sup>	0.5 $\pm$ 0.3 <sup>a</sup>	2.5 $\pm$ 0.4 <sup>b</sup>	4.6 $\pm$ 0.4 <sup>c</sup>

Totals include some minor components not shown. Superscripts (a, b, c) denote significant differences among groups ( $P < 0.05$ ,  $F_{3,11}$ ).

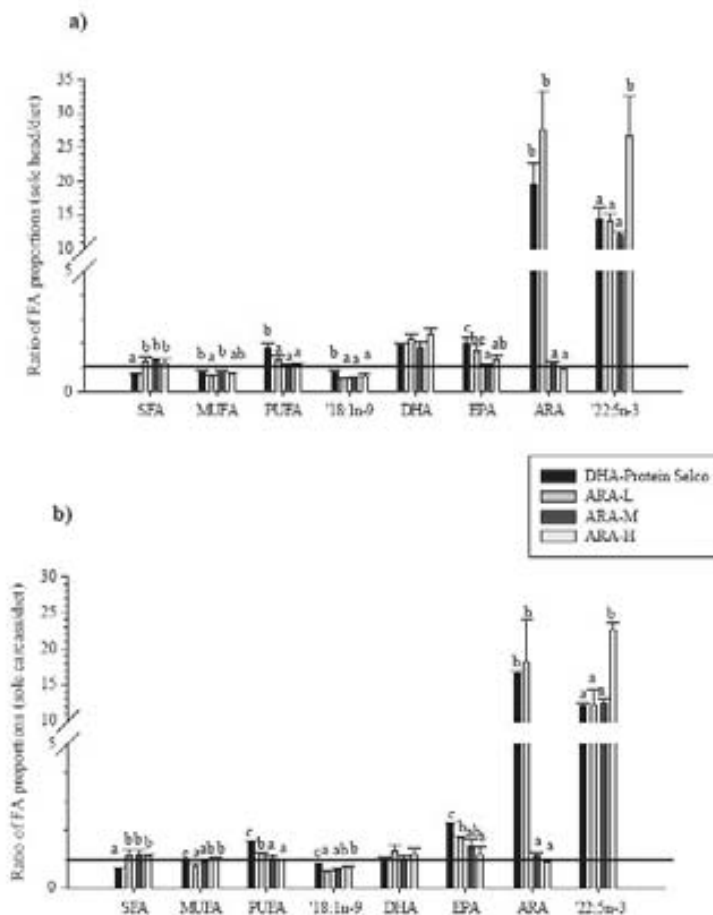


Fig. 3. Relative proportions of fatty acids in the (a) head or (b) carcass of Senegal sole larvae fed *Artemia* enriched on commercial (DHA-Protein Selco) or experimental (ARA-L, -M, -H) emulsions (mean  $\pm$  SD,  $n=3$ ). The horizontal bar indicates the point where the proportion of fatty acids in the tissues and diet are identical. Values above this line indicate a greater proportion of fatty acids in the tissue relative to the diet, and viceversa.

the tissues was inversely and significantly related to dietary ARA concentration ( $P=0.011$ ,  $r^2=0.528$  for head,  $P=0.019$ ,  $r^2=0.519$  for carcass and  $P=0.06$ ,  $r^2=0.304$  for gut).

Levels of dietary fatty acids affected retention in the larval tissues (Fig. 3). All larvae had lower relative levels of 18:1n-9 in their tissues than in their diet, while PUFA, and especially DHA, EPA and DPA, were found in higher proportions in the tissues relative

to the diet. Larvae fed ARA-L and DHA-Protein Selco enriched *Artemia* had higher levels of ARA in their tissues than in the diet. Significant, positive linear regressions were found between the absolute amounts of dietary ARA to that found in the head (ARA=14.02  $\pm$  1.64  $\times$  dietary ARA,  $P=0.002$ ,  $r^2=0.726$ ), the gut (ARA=81.72  $\pm$  0.43  $\times$  dietary ARA,  $P=0.07$ ,  $r^2=0.63$ ) and the carcass (ARA=10.20  $\pm$  1.25  $\times$  dietary ARA,  $P=0.009$ ,  $r^2=0.349$ ).

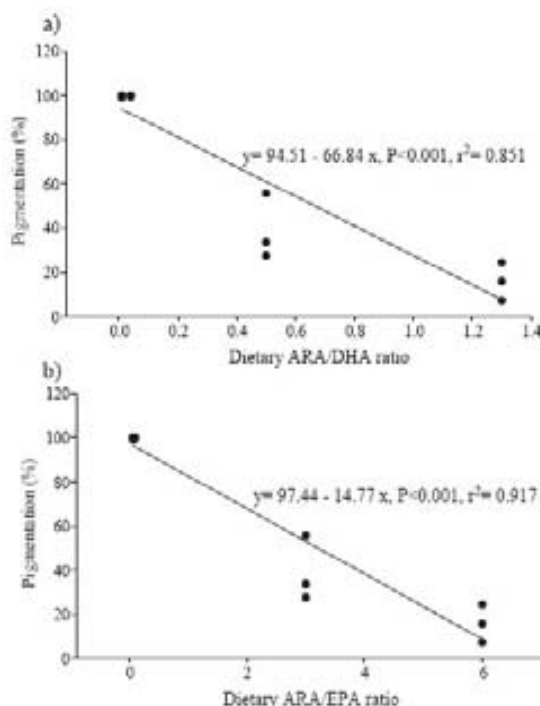


Fig. 4. Relationship between dietary ARA/DHA and ARA/EPA ratios and pigmentation success of 37 dph Senegal sole larvae. Linear regressions have been fitted to the replicate data ( $n=12$ ).

### 3.4. Effects of diet on pigmentation rate

Significant differences ( $P < 0.0001$ ,  $F_3$ , 11, Table 3) were found in pigmentation rate, with almost 100% pigmentation recorded in DHA-Protein Selco and ARA-L fed larvae while significantly higher proportions of malpigmented larvae were found in groups fed with ARA-M and ARA-H enriched live prey. A significant, negative linear regression was found between the ARA content in the head and pigmentation rate (Pigmentation =  $149.23 - 3.12$  ARA,  $P = 0.0012$ ,  $r^2 = 0.706$ ), whereas for EPA the regression was positive and weak (Pigmentation =  $-1.14 \pm 4.56$  EPA,  $P = 0.0097$ ,  $r^2 = 0.543$ ). Thus, a clear relationship can be established between the dietary content of ARA, the accumulation of ARA observed in larval tissues, concomitant with a displacement in tissue EPA, and the pigmentation rate in Senegal sole larvae. As a result the dietary ratios in which ARA are

involved were significantly associated with pigmentation success (Fig. 4).

### 4. Discussion

This study is the first to examine the effect of dietary fatty acids on larval Senegal sole performance using a dose-response design. Survival and growth rates were not affected by dietary ARA, even at very high concentrations (up to 8% of the total FA,  $40.53$  mg  $g^{-1}$  of total lipids). Other authors have also shown that dietary ARA can be provided in very high amounts in other flatfish species during larval development, including summer flounder (Willey et al., 2003) yellowtail flounder (Copeman et al., 2002), turbot (Estévez et al., 1999) and halibut (McEvoy et al., 1998a), with no effect on growth or survival. DHA-Protein Selco contains other nutritional compo-

nents not specifically provided in the experimental emulsions, such as proteins and vitamins. Subsequently it was not surprising that larvae fed DHA-Protein Selco-enriched live feeds were slightly larger than their counterparts fed experimentally enriched live feeds and, as a result, the DHA-Protein Selco-fed larvae showed advanced metamorphosis (Fig. 2). This was particularly evident between 15 and 20 dph when the most pronounced metamorphic events occur. Faster growing larvae generally metamorphose more quickly than their slower growing counterparts (Naess and Lie, 1998), with slower growing larvae often recording higher mortality at the end of the transformation process (Christensen and Korsgaard, 1999). However no significant differences were recorded in survival of the larvae at the conclusion of the experiment suggesting the slight differences in growth were not important for this species in terms of survival. Interestingly, increasing dietary ARA slowed the rate of metamorphic events, such as eye migration. At 15 and 20 dph, of the experimentally fed larvae, larvae fed ARA-L had the highest eye migration indexes, followed by larvae fed ARA-M, while those fed ARA-H had the lowest eye migration indexes. As growth was not related to dietary ARA, some other mechanism was causing these differences. This suggests that ARA and its derivatives can directly influence metamorphic processes in flatfish, although the biochemical mechanisms causing this are not well understood.

The initial larvae contained especially high proportions of DHA, 16:0, 18:1n-9, 18:0 and DPA, which is consistent with initial values recorded in other larval marine fish (Izquierdo, 1996). Similar results in the FA composition of sole larvae at 1 dph, in relative and absolute amounts, were found by Vázquez et al. (1994) and Mourente and Vázquez (1996). Senegal sole larvae fed the experimental diets had fatty acid compositions that generally reflected dietary proportions, which is consistent with other studies on larval fish (Mourente et al., 1993; Harel et al., 2000; Koven et al., 2001; Bransden et al., 2004). ARA accumulation in larval tissues was proportional to dietary content with up to 40 mg g<sup>-1</sup> lipid found in the head of the fish. The dietary effect was more pronounced in the head and the gut than in the carcass composition. Similar results were observed in turbot (Estévez et al., 1999). DHA content was more than 50% higher in the

head than in the other tissues showing the essentiality of this fatty acid in neural and visual tissues (Mourente et al., 1991; Bell et al., 1995b). No changes in DHA tissue content were observed in relation to dietary ARA input, contrary to the observations of Harel et al. (2000) in white sea bass larvae. EPA content, on the other hand, was significantly reduced with increasing uptake of ARA in all the tissues examined, with this reduction significantly higher in the head and gut than in the carcass lipids. Similar effects of dietary ARA on EPA tissue content have been observed in other marine (Estévez et al., 1999; Willey et al., 2003) and freshwater (Harel et al., 2000) fish larvae which has been attributed to the competitive interaction between these two fatty acids (Tocher and Sargent, 1986; Bell et al., 1995a). Harel et al. (2000) used linear regression analysis between fatty acids in relation to ARA levels in larval tissues to calculate the displacement or accumulation rates of each fatty acid in the tissues. Using this method we only obtained a significant regression between ARA and EPA contents in the gut. In this case the rate of displacement was  $0.147 \pm 0.073$  mg EPA per mg ARA ( $r^2=0.286$ ,  $P=0.07$ ). Except for the reduction in EPA tissue levels with increasing ARA, no other competition between tissue fatty acids could be observed in Senegal sole larvae.

DHA-Protein Selco and ARA-L fed fish showed high retention of ARA, which was not surprising given that initial larvae contained 2.9% ARA compared to only 0.1–0.2% in the DHA-Protein Selco and ARA-L diets. As more dietary ARA was provided the retention of this fatty acid was significantly reduced. DHA content was similar in all the diets and in all the groups of fish, although initial proportions of DHA (24.2% TFA) were approximately 3 times higher than those found in all groups of larvae (approximately 8% TFA) at 37 dph. Sargent et al. (1999) have proposed that the requirements of essential fatty acids can be defined by examining the proportions found in the egg. While egg fatty acid contents were not measured in the present experiment, the DHA value of 24.2% TFA found in pre-feeding larvae is substantially higher than the proportion of DHA that was being provided in all diets (average of 7.3% TFA). This provides some indication that dietary DHA was probably not sufficiently provided. Interestingly DPA, which was provided at less than 0.3% TFA in

all diets, was found in high proportions in larval tissues, reaching levels  $100\times$  greater than those in the diet. Due to a limited expression of elongase and desaturase genes, marine fish have limited capacity to convert 18:3n-3 to longer chain n-3 PUFA (Sargent et al., 2002; Tocher, 2003). On the other hand, some species have some ability to convert EPA to DHA, it is at low rates only (Sargent et al., 1989, 1995). Elongase enzymes quickly facilitate the conversion of EPA to DPA. However, final conversion of DPA to DHA is more complex, with elongation, desaturation and chain shortening steps all being required, making this the rate-limiting process. Consequently marine fish fed inadequate dietary DHA are unable to completely elongate and desaturate EPA to DHA rapidly enough to meet requirements, and subsequently the intermediate product, DPA, often accumulates. This has been supported with studies on other marine fish larvae (Izquierdo et al., 1992; Bell et al., 1995b; Bransden et al., 2004). Accumulation of DPA in the present experiment is consistent with dietary DHA being below the requirement for Senegal sole larvae and that, like other marine fish, Senegal sole has limited capacity to completely convert EPA to DHA. As DHA concentration was the same across all treatments, supplying DHA presumably below the requirements will not mask effects induced by graduated ARA concentrations. However, further work is required to determine optimal DHA requirements for this species.

There is a clear relationship between the dietary content of ARA, the accumulation of ARA in larval tissues and the pigmentation rate of the fish, as other authors have already indicated (McEvoy et al., 1998a; Estévez et al., 1999; Copeman et al., 2002). Willey et al. (2003) fed ARA enriched rotifers and *Artemia* to summer flounder and found a dose-dependent effect of increasing dietary ARA and the incidence of malpigmentation (Willey, personal communication, 2004). In the present study, ARA/EPA ( $r^2=0.917$ ,  $P<0.0001$ ) and ARA/DHA ( $r^2=0.851$ ,  $P<0.0001$ ) dietary ratios were found to be related to pigmentation rate (Fig. 4). Nutritional experiments with other larval flatfish support that dietary ARA/EPA is important in pigmentation success (Table 7). However, DHA/EPA ( $r^2=0.509$ ,  $P>0.1$ ) ratio, which other authors (Reitan et al., 1994) have reported to have a positive effect on flatfish pigmentation, did not show any relationship

with pigmentation rate in the present study. Further, it is becoming more evident that dietary DHA probably is not a factor in flatfish pigmentation. For example, Seikai et al. (1987) fed unenriched, and DHA-free, *Artemia* nauplii to Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) that resulted in up to 76% normal pigmentation. Copeman et al. (2002) fed rotifers with only 1.7% DHA to yellowtail flounder larvae and obtained one of the highest pigmentation rates (46%) recorded in their study (Table 7).

The exact mechanism causing ARA-induced malpigmentation in flatfishes remains unknown, but three hypotheses have been postulated. Firstly, altering dietary ARA can result in a sub-optimal biochemical composition of the membranes of neural tissues involved in the control of metamorphosis, melanin synthesis and chromatophore differentiation (Estévez et al., 1999). Secondly, excess production of ARA-derived eicosanoids results in fish experiencing a biochemically-induced stress (Sargent et al., 1999). Thirdly, tyrosinase synthesis and degradation, which is necessary for regulating pigmentation, can be modified by dietary n-6 PUFA (Ando et al., 2004). Estévez et al. (2001) found that malpigmented Japanese flounder induced by dietary ARA modification produced similar amounts of melanocortins ( $\alpha$ -melanocyte stimulating hormone,  $\alpha$ -MSH, and adrenocorticotropin, ACTH) which are important in the pigmentation process, compared with normally pigmented individuals, possibly invalidating the first hypothesis although the work would need to be confirmed in other flatfish species. We did not quantify the production of eicosanoids in the present experiment. However, dose-response relationships between dietary ARA (using formulations and ingredients similar to those in the present study) and whole body prostaglandin  $E_2$  ( $PGE_2$ ) concentrations exist for marine larva of striped trumpeter and Atlantic cod (Bransden et al., unpublished data).  $PGE_2$  may be involved in the stress response of fish through modulation of cortisol release (Gupta et al., 1985; Koven et al., 2003) and Sargent et al. (1999) have hypothesised that malpigmentation could be caused by a biochemical stress.  $PGE_2$  has also been linked to  $\alpha$ -MSH (Naveh et al., 2000). These studies suggest an influence of dietary ARA on  $PGE_2$  synthesis which, in turn, may be affecting pigmentation in Senegal sole larvae. However, further work is required to validate this point.

Table 7

Dietary DHA content (% TFA) and EPA/ARA ratio (in the rotifer, *Artemia* or natural zooplankton, depending on the species) and pigmentation success of different species of flatfish according to the existing literature in flatfish larviculture<sup>a</sup>

Dietary DHA (%)	Dietary ARA (%)	Dietary ratio ARA/EPA	% Pigmentation	Species	Reference
6.8	0.2	0.11	100	Senegal sole	This study
6.8	0.1	0.07	100		
8.9	4.5	3.00	39		
6.6	8.3	5.93	16		
6.5	1.0	0.12	56	Turbot	Estévez and Kanazawa (1995)
1.3	0.6	0.18	27		
0.0	0.0	0.00	0		
3.5	1.0	0.03	82	Turbot	Estévez et al. (1999)
3.0	1.2	0.10	86		
10.0	1.8	0.24	86		
9.9	2.5	0.33	79		
8.9	4.8	0.69	33		
6.9	7.9	1.44	1		
21.8	1.8	0.17	40	Halibut	Shields et al. (1999)
5.1	1.5	0.28	3.5		
39.4	0.3	0.03	99	Halibut	McEvoy et al. (1998b)
5.2	1.5	0.12	66		
32.9	0.8	0.02	100	Halibut	Naess et al. (1995)
5	1.7	0.17	29		
0.2	2.3	0.64	4		
0.0	1.4	0.15	17	Japanese flounder	Seikai et al. (1987)
0.0	0.8	0.33	76		
0.0	4.3	0.70	0		
0.4	1.6	0.11	11	Japanese flounder	Yamamoto et al. (1992)
13.3	0.8	0.12	88		
0.4	2.0	0.13	11		
6.9	0.6	0.06	63	Plaice	Dickey-Collas and Geffen (1992)
0.0	0.5	0.26	29		
21.5	2.2	0.20	39	Yellowtail flounder	Copeman et al. (2002)
1.7	0.7	0.28	46		
28.2	1.2	0.34	47		
23.4	7.1	2.21	8		

<sup>a</sup> Only those references in which the FA composition of the diet was given were selected. Values in bold represent those that did not correspond with the usual trend, that is the higher the ARA/EPA ratio the higher the incidence of malpigmentation of the fish.

Recent findings by Ando et al. (1999, 2004) and Stöckli (2002) using mouse melanoma cells cultured with linoleic acid (18:2n-6, LA) enriched medium (25 µM) showed a 30% reduction in melanin content and 50% reduction of tyrosinase, one of the enzymes involved in melanin synthesis. Topical administration of this fatty acid has been used to prevent hyperpigmentary disorders in humans, such as melasma (Lee et al., 2002) and UV induced pigmentation (Ando et al., 1998). Ando et al. (2004) observed that LA accelerated the spontaneous degradation of tyrosinase. As an ideal balance between tyrosinase synthesis and degradation is necessary for regulating pigmentation, these findings may be particularly

relevant to the present study. In fact, other studies using low concentrations of ARA reported a similar effect on tyrosinase (Ando et al., personal communication, 2004).

In summary, dietary ARA had no effect on growth or survival of larval Senegal sole up to 37 dph. A commercially available enrichment promoted the best growth and is probably advantageous in expediting metamorphosis, although it did not improve overall survival. Increasing dietary ARA slowed the metamorphic events during critical stages, indicating the importance of this fatty acid and its derivatives on flatfish metamorphosis. The fatty acid profile of tissues generally reflected that of the diet, with the



exception of a competitive interaction between dietary ARA and tissue EPA, PUFA were strongly retained in the tissues relative to the diet. There was almost a 100-fold increase in the proportion of docosapentaenoic acid (22:5 n-3, DPA) in the tissues relative to the diet, which might indicate chain elongation from EPA as a result of inadequate dietary DHA. Similar to other studies on marine flatfish, a strong relationship was detected between the dietary ARA/EPA ratio and pigmentation. The exact mechanism causing ARA-induced malpigmentation in flatfish remains unknown, although it is likely an effect of excessive eicosanoid production or inadequate regulation of tyrosinase.

## 5. Uncited reference

Abellan and Basurco, 1999

## Acknowledgements

Senegal sole eggs were generously donated by CICEM "El Toruño" (Cádiz, Spain). Vevodar® oil was provided by DSM Food Specialties, Netherlands. Olive oil was provided by Lakelands Olives (NSW, Australia). M.V. thanks the financial support provided by Generalitat de Catalunya (DURSI scholarship). Funding was partially provided to A.E. by the Spanish Ministries of Science and Education (INIA project ACU-02-006) and Agriculture, Fisheries and Food (Jacumar), and by the Generalitat de Catalunya (CRA). M.P.B. was financially supported by the Australian Aquafin CRC. Thanks are also due to J. Canoura, G. Macià and M. Monllao for their help during larval rearing, to O. Bellot and J.C. Navarro for their help during lipid and fatty acid analysis and to J.R. Sargent for his valuable comments and critical reading of the manuscript.

## References

- Abellan, E., Basurco, B. (Eds.), 1999. Family Soleidae, *Cahiers Options Méditerranéennes*, vol. 24, pp. 69–72.
- Ando, H., Ryu, A., Hashimoto, A., Oka, M., Ichibashi, M., 1998. Linoleic acid and alpha-linolenic acid lightens ultraviolet-induced hyperpigmentation of the skin. *Arch. Dermatol. Res.* 290, 375–381.
- Ando, H., Fumasaka, Y., Oka, M., Ohashi, A., Furumura, M., Matsunaga, J., Matsunaga, N., Hearing, V.J., Ichibashi, M., 1999. Possible involvement of proteolytic degradation of tyrosinase in the regulatory effect of fatty acids on melanogenesis. *J. Lipid Res.* 40, 1312–1316.
- Ando, H., Watabe, H., Valencia, J.C., Yasumoto, K., Furumura, M., Fumasaka, Y., Oka, M., Ichibashi, M., Hearing, V.J., 2004. Fatty acids regulate pigmentation via proteasomal degradation of tyrosinase—a new aspect of ubiquitin-proteasome function. *J. Biol. Chem.* 279, 15427–15433.
- Arango, C., Conceição, L.E.C., Martins, D., Ronnestad, I., Gomes, E., Dinis, M.T., 2004. A balanced dietary amino acid profile improves amino acid retention in post-larval Senegalese sole (*Solea senegalensis*). *Aquaculture* 233, 293–304.
- Bell, J.G., Tocher, D.R., Sargent, J.R., 1994. Effect of supplementation of 20:3(n-6), 20:4(n-6) and 20:5(n-3) on the production of prostaglandins E and F of the 1-, 2- and 3- series in turbot (*Scophthalmus maximus*) brain astroglial cells in primary culture. *Biochim. Biophys. Acta* 1211, 335–342.
- Bell, J.G., Castell, J.D., Tocher, D.R., MacDonald, F.M., Sargent, J.R., 1995a. Effects of different dietary arachidonic acid-docosahexaenoic acid ratios on phospholipid fatty acid compositions and prostaglandin production in juvenile turbot (*Scophthalmus maximus*). *Fish Physiol. Biochem.* 14, 139–151.
- Bell, M.V., Batty, R., Navarro, J.C., Sargent, J.R., Dick, J.R., 1995b. Dietary deficiency of docosahexaenoic acid impairs vision at low light intensities in juvenile herring (*Clupea harengus* L.). *Lipids* 30, 443–449.
- Bell, J.G., McEvoy, L.A., Estévez, A., Shields, R.J., Sargent, J.R., 2003. Optimising lipid nutrition in first-feeding flatfish larvae. *Aquaculture* 227, 211–220.
- Bolker, J.A., Hill, C.R., 2000. Pigmentation development in hatchery-reared flatfishes. *J. Fish Biol.* 56, 1029–1052.
- Branden, M.P., Dunstan, G.A., Battaglene, S.C., Cobcroft, J.M., Morehead, D.T., Kolkovski, S., Nichols, P.D., 2004. Influence of dietary n-3 long chain PUFA on body concentrations of 20:5n-3, 22:5n-3 and 22:6n-3 in larvae of a marine teleost fish from Australian waters, the striped trumpeter (*Lateolabrax lineatus*). *Lipids* 39, 215–222.
- Cañavate, J.P., Fernandez-Diaz, C., 1999. Influence of co-feeding larvae with live and inert diets on weaning the sole *Solea senegalensis* onto commercial dry feeds. *Aquaculture* 174, 255–263.
- Carbó, R., Estévez, A., Farnes, M.D., 2003. Intelligent and multifunctional recirculation system. Its application in research at CA-IRTA. *Spec. Publ.-EAS* 32, 171–172.
- Christensen, M.N., Korsgaard, B., 1999. Protein metabolism, growth and pigmentation patterns during metamorphosis of plaice (*Pleuronectes platessa*) larvae. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 237, 225–241.
- Christie, W.W., 1982. *Lipid Analysis*. Pergamon, Oxford, UK, 207 pp.
- Copeman, L.A., Parrish, C.C., Brown, J.A., Harel, M., 2002. Effects of docosahexaenoic, eicosapentaenoic, and arachidonic acids on the early growth, survival, lipid composition and pigmentation of yellowtail flounder (*Limanda ferruginea*): a live food enrichment experiment. *Aquaculture* 210, 285–304.

- Day, O.J., Howell, B.R., Aiknes, A., Nygard, E., 1999. A new weaning diet for *Solea* spp. *Spec. Publ.-EAS* 27, 40–41.
- Dhert, P., Lavens, P., Duray, M., Sorgeloos, P., 1990. Improved larval survival at metamorphosis of Asian seabass (*Lateolabrax niloticus*) using omega 3-HUFA-enriched live prey. *Aquaculture* 90, 63–74.
- Dickey-Collas, M., Geffen, A.J., 1992. Importance of the fatty acids 20:5ω3 and 22:6ω3 in the diet of plaice (*Pleuronectes platessa*) larvae. *Mar. Biol.* 113, 463–468.
- Dinis, M.T., 1986. Quatre Soleidae de l'Estuaire du Tage. Reproduction et croissance. Essai d'élevage de *Solea senegalensis* Kaup 1858. Thèse d'État ès-Sciences Naturelles, Univ. Bretagne Occidentale, France.
- Dinis, M.T., 1992. Aspects of the potential of *Solea senegalensis* for aquaculture: larval rearing and weaning to an artificial diet. *Aquac. Fish. Manage.* 23, 515–520.
- Dinis, M.T., Ribeiro, L., Soares, F., Saragoço, C., 1999. A review on the cultivation potential of *Solea senegalensis* in Spain and in Portugal. *Aquaculture* 176, 27–38.
- Dinis, M.T., Ribeiro, L., Conceição, L.E.C., Aragão, C., 2000. Larvae digestion and new weaning experiments in *Solea senegalensis*. *Cah. Options Méditerran.* 47, 193–204.
- Drake, P., Arias, A.M., Rodríguez, A., 1984. Cultivo extensivo de peces marinos en los esteros de las salinas de San Fernando (Cádiz): II. Características de la producción de peces. *Inf. Tec. Inst. Investig. Pesq.* 116, 1–23.
- Engrola, S., Conceição, L.E.C., Dinis, M.T., 2001. Effect of preweaning feeding regime on weaning success of *Solea senegalensis*. *EAS Spec. Publ.* 30, 178–181.
- Estévez, A., Kanazawa, A., 1995. Effect of (n-3) PUFA and vitamin A *Artemia* enrichment on pigmentation success of turbot *Scophthalmus maximus* (L.). *Aquac. Nutr.* 1, 159–168.
- Estévez, A., McEvoy, L.A., Bell, J.G., Sargent, J.R., 1999. Growth, survival, lipid composition and pigmentation of turbot (*Scophthalmus maximus*) larvae fed live prey enriched in arachidonic and eicosapentaenoic acids. *Aquaculture* 180, 321–343.
- Estévez, A., Kaneko, T., Seikai, T., Dores, R.M., Tagawa, M., Tanaka, M., 2001. Ontogeny of ACTH and MSH cells in Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) in relation to albinism. *Aquaculture* 202, 131–143.
- Folch, J., Lees, N., Sloane-Stanley, G.H., 1957. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J. Chromatogr.* 43, 120–126.
- Gupta, O.P., Lahlou, B., Botella, J., Porthe-Nibelle, J., 1985. In vivo and in vitro studies on the release of cortisol from interrenal tissue in trout: 1. Effect of ACTH and prostaglandins. *Exp. Biol.* 43, 201–212.
- Harel, M., Lund, E., Gavasso, S., Herbert, R., Place, A.R., 2000. Modulation of arachidonate and docosahexaenoate in *Morone chrysops* larval tissues and the effect on growth and survival. *Lipids* 35, 1269–1280.
- Howell, B.R., Beard, T.W., Hallam, J.D., 1995. The effect of diet quality on the low-temperature tolerance of juvenile sole, *Solea solea* (L.). *ICES CM* 1995/F:13, 9 pp.
- Izquierdo, M.S., 1996. Essential fatty acid requirements of cultured marine fish larvae. *Aquac. Nutr.* 2, 183–191.
- Izquierdo, M.S., Arakawa, T., Takeschi, T., Haroun, R., Watanabe, T., 1992. Effect of n-3 HUFA levels in *Artemia* on growth of larval Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*). *Aquaculture* 105, 73–82.
- Koven, W., Bari, Y., Lutzky, S., Ben-Atia, I., Weiss, R., Harel, M., Behrens, P., Tandler, A., 2001. The effect of dietary arachidonic acid (20:4ω6) on growth, survival and resistance to handling stress in gilthead seabream (*Sparus aurata*) larvae. *Aquaculture* 193, 107–122.
- Koven, W., van Anholt, R., Lutzky, S., Ben-Atia, I., Nixon, O., Ron, B., Tandler, A., 2003. The effect of dietary arachidonic acid on growth, survival, and cortisol levels in different-age gilthead seabream larvae (*Sparus aurata*) exposed to handling or daily salinity change. *Aquaculture* 228, 307–320.
- Lee, M., Kim, H., Ha, D., Paik, J., Kim, H., 2002. Therapeutic effect of topical application of linoleic acid and Lincomycin in combination with Betamethasone Valerate in melasma patients. *J. Korean Med. Sci.* 17, 518–523.
- McEvoy, L.A., Estévez, A., Bell, J.G., Shields, R.J., Gara, B., Sargent, J.R., 1998a. Influence of dietary levels of eicosapentaenoic and arachidonic acids on the pigmentation success of turbot (*Scophthalmus maximus* L.) and halibut (*Hippoglossus hippoglossus* L.). *Bull.-Aquac. Assoc. Can.* 98-4, 17–20.
- McEvoy, L.A., Naess, T., Bell, J.G., Lie, O., 1998b. Lipid and fatty acid composition of normal and malpigmented Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*) fed enriched *Artemia*: a comparison with fry fed wild copepods. *Aquaculture* 163, 237–250.
- Morais, G., Lacuisse, M., Conceição, L.E.C., Dinis, M.T., Ronnestad, L., 2004. Ontogeny of the digestive capacity of Senegal sole (*Solea senegalensis*), with respect to digestion, absorption and metabolism of amino acids from *Artemia*. *Mar. Biol.* 145, 243–250.
- Mourente, G., Vázquez, R., 1996. Changes in the content of total lipid, lipid classes and their fatty acids of developing eggs and unfed larvae of the Senegal sole *Solea senegalensis* Kaup. *Fish Physiol. Biochem.* 15, 221–235.
- Mourente, G., Tocher, D.R., Sargent, J.R., 1991. Specific accumulation of docosahexaenoic acid (22:6n-3) in brain lipids during development of juvenile turbot (*Scophthalmus maximus* L.). *Lipids* 26, 871–877.
- Mourente, G., Rodriguez, A., Tocher, D.R., Sargent, J.R., 1993. Effects of dietary docosahexaenoic acid (DHA, 22:6n-3) on lipid and fatty acid compositions and growth in gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.) larvae during first feeding. *Aquaculture* 112, 79–98.
- Naess, T., Lie, O., 1998. A sensitive period for the determination of pigmentation pattern in Atlantic halibut, *Hippoglossus hippoglossus*, juveniles: the role of diet. *Aquac. Res.* 29, 925–934.
- Naess, T., Germain-Henry, M., Naas, K.E., 1995. First feeding of Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*) using different combinations of *Artemia* and wild zooplankton. *Aquaculture* 130, 235–250.
- Naveh, N., Kaplan-Menas, A., Marshall, J., 2000. Mechanism related to reduction of intraocular pressure by melanocortins in rabbits. *Brit. J. Ophthalmology* 84, 1411–1414.

- Padrós, F., Zarza, C., Estévez, A., Crespo, S., Furones, M.D., 2003. La Patología como factor limitante para el desarrollo del cultivo del lenguado. Proc. IX Congr. Nal. Acuicultura, Cádiz, Spain.
- Reitan, K.I., Rainuzzo, J.R., Olsen, Y., 1994. Influence of lipid composition of live feed on growth, survival and pigmentation of turbot larvae. *Aquac. Int.* 2, 33–48.
- Ribeiro, L., Engrola, S., Dinis, M.T., 2003. Weaning of Senegal sole, *Solea senegalensis*, post-larvae. Proc. World Aquaculture 2003, Salvador de Bahia, Brasil.
- Rodríguez, R.B., 1984. Biología y cultivo de *Solea senegalensis* Kaup 1858 en el Golfo de Cádiz. PhD thesis, Univ. Sevilla, Spain.
- Rønnestad, I., Conceição, L.E.C., Aragao, C., Dinis, M.T., 2000. Free amino acids are absorbed faster and assimilated more efficiently than protein in postlarval Senegal sole (*Solea senegalensis*). *J. Nutr.* 130, 2809–2812.
- Rønnestad, I., Conceição, L.E.C., Aragao, C., Dinis, M.T., 2001. Assimilation and catabolism of dispensable and indispensable free amino acids in post-larval Senegal sole (*Solea senegalensis*). *Comp. Biochem. Physiol., Part C Pharmacol. Toxicol.* 130, 461–466.
- Sargent, J.R., Henderson, R.J., Tocher, D.R., 1989. The lipids. In: Halver, J.E. (Ed.), *Fish Nutrition*. Academic Press, San Diego, CA, pp. 153–218.
- Sargent, J.R., Bell, J.G., Bell, M.V., Henderson, R.J., Tocher, D.R., 1995. Requirement criteria for essential fatty acids. *J. Appl. Ichthyol.* 11, 183–198.
- Sargent, J., McEvoy, L., Estévez, A., Bell, G., Bell, M., Henderson, J., Tocher, D., 1999. Lipid nutrition of marine fish during early development: current status and future directions. *Aquaculture* 179, 217–229.
- Sargent, J.R., Tocher, D.R., Bell, J.G., 2002. The lipids. In: Halver, J.E., Hardy, R.W. (Eds.), *Fish Nutrition*. Academic Press, San Diego, CA, USA, pp. 181–257.
- Seikai, T., Shimozaki, M., Watanabe, T., 1987. Estimation of larval triglycerides determining the appearance of albinism in hatchery-reared juvenile flounder *Paralichthys olivaceus*. *Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish.* 51, 521–527.
- Shields, R.J., Bell, J.G., Luzzi, F.S., Gara, B., Bromage, N.R., Sargent, J.R., 1999. Natural copepods are superior to enriched *Artemia* nauplii as feed for halibut larvae (*Hippoglossus hippoglossus*) in terms of survival, pigmentation and retinal morphology: relation to dietary fatty acids. *J. Nutr.* 129, 1186–1194.
- Soares, F., Engrola, S., Dinis, M.T., 2001. Anomalias en la pigmentación de juveniles de lenguado (*Solea senegalensis*). *Bol. Inst. Esp. Oceanogr.* 18, 405–408.
- Sokal, R.R., Rohlf, F.J., 1995. *Biometry*. Freeman, NY, USA, 859 pp.
- Sølbakken, J.S., Norberg, B., Watanabe, K., Pimman, K., 1999. Thyroxine as a mediator of metamorphosis of Atlantic halibut, *Hippoglossus hippoglossus*. *Environ. Biol. Fishes* 56, 53–65.
- Südkli, M., 2002. Influence of the polyunsaturated fatty acids linoleic acid, arachidonic acid,  $\alpha$ -linolenic acid and  $\gamma$ -linolenic acid on melanogenesis of B16 mouse melanoma cells and normal human melanocytes. PhD thesis, Univ. Basel, Switzerland, 114 pp.
- Tocher, D.R., 2003. Metabolism and function of lipids and fatty acids in teleost fish. *Rev. Fish. Sci.* 2, 107–184.
- Tocher, D.R., Sargent, J.R., 1986. Incorporation of [1-14C] arachidonic and [1-14C] eicosapentaenoic acid into the phospholipids of peripheral blood neutrophils from the plaice *Pleuronectes platessa* L. *Biochim. Biophys. Acta* 876, 592–600.
- Vazquez, R., Gonzalez, S., Rodríguez, A., Mourente, G., 1994. Biochemical composition and fatty acid content of fertilized eggs, yolk sac stage larvae and first feeding larvae of the Senegal sole (*Solea senegalensis* Kaup). *Aquaculture* 119, 273–286.
- Venizelos, A., Benetti, D.D., 1999. Pigment abnormalities in flatfish. *Aquaculture* 176, 181–188.
- Wiley, S., Bengtson, D.A., Harel, M., 2003. Arachidonic acid requirements in larval summer flounder *Paralichthys dentatus*. *Aquac. Int.* 11, 131–149.
- Yamamoto, T.S., Fukushima, K., Okouchi, M., Tanaka, H., Nagata, W.D., Seikai, T., Watanabe, T., 1992. Effects of various foods during metamorphosis on albinism in juvenile of flounder. *Nippon Suisan Gakkaishi* 58, 499–508.
- Zarza, C., Padrós, F., Estévez, A., Crespo, S., Furones, M.D., 2003. New fish species for aquaculture, old pathological problems: the case of *Solea* sp. Proc. 11th European Assoc. Fish Pathologist, St Julians, Malta.





## The effect of graded concentrations of dietary DHA on growth, survival and tissue fatty acid profile of Senegal sole (*Solea senegalensis*) larvae during the *Artemia* feeding period

Mireia Villalta<sup>a,d</sup>, Alicia Estévez<sup>b,\*</sup>, Matthew P. Bransden<sup>b</sup>, J. Gordon Bell<sup>c</sup>

<sup>a</sup>Centro de Acuicultura-IRTA and Centro de Referencia en Acuicultura, Generalitat de Catalunya, Ctra. Poble Nou Km 6, 43540 San Carlos de la Ràpita, Tarragona, Spain

<sup>b</sup>Marine Research Laboratories, Tasmania Aquaculture and Fisheries Institute and Aquafin Cooperative Research Centre (CRC), University of Tasmania, Hobart, Tasmania, 7001, Australia

<sup>c</sup>Institute of Aquaculture, University of Stirling, Stirling FK9 4LA, Scotland, UK

<sup>d</sup>Universidad Autónoma de Barcelona, Programa de Doctorado en Acuicultura, Spain

Received 16 December 2004; received in revised form 16 March 2005; accepted 16 March 2005

### Abstract

We examined the effect of dietary docosahexaenoic acid (22:6n-3, DHA) on growth, survival, pigmentation and fatty acid composition of Senegal sole larvae using a dose–response design. From 3 to 35 days post-hatch (dph), larvae were fed live food (rotifers from 3 to 9 dph, *Artemia* nauplii from 5 to 35 dph) that had been enriched using one of four experimental emulsions containing four graduated concentrations of DHA and constant arachidonic acid (20:4n-6, ARA) and eicosapentaenoic acid (20:5n-3, EPA). Final proportions of DHA in the enriched *Artemia* nauplii were described as ‘nil’ (DHA-N, 0.0% total fatty acids, TFA), ‘low’ (DHA-L, 4.4% TFA), ‘medium’ (DHA-M, 7.7% TFA) or ‘high’ (DHA-H, 14.7% TFA). Significant differences among dietary treatments in larval length occurred at 20, 30 and 36 dph, and in dry weight at 20 and 30 dph, although there was no significant relationship between dietary DHA and growth. The stage of eye migration at 20 dph was significantly affected by dietary levels of DHA. No significant differences in survival were obtained. Tissue fatty acid concentrations reflected the corresponding dietary composition. Fish fed DHA-M and -H enriched nauplii tended to accumulate less lipid, mainly oleic acid (OA), in the carcass that might have caused the lower growth in length observed in DHA-H fish. We hypothesise that negligible amounts of dietary DHA required for normal development in Senegal sole larvae relate to a predominance of EPA rather than DHA in the benthic fauna which this flatfish consumes in the wild post-settlement. © 2005 Elsevier B.V. All rights reserved.

**Keywords:** Docosahexaenoic acid; Fatty acid; Larvae; *Solea senegalensis*; Enrichment; Live food

\* Corresponding author. Tel.: +34 977745427; fax: +34 977744138.  
E-mail address: [alicia.estevez@irta.es](mailto:alicia.estevez@irta.es) (A. Estévez).

## 1. Introduction

The Senegal sole is a flatfish found along the Mediterranean and South Atlantic coasts, and is a prime candidate for aquaculture in these areas due to good market prices (15–17 euro kg<sup>-1</sup>, commercial size  $\geq 200$  g). The rearing methods for this species have been well documented (Dinis et al., 1999), although high mortalities during the weaning phase possibly due to inadequate nutrition and pathological problems (Zarza et al., 2003) as well as poor success obtaining eggs from captive breeders (Anguis and Cañavate, 2005) are constraints for the continued development of the industry.

Docosahexaenoic acid (22:6n-3, DHA) is considered together with eicosapentaenoic (20:5n-3, EPA) and arachidonic (20:4n-6, ARA) acids as essential fatty acids (EFA) for marine fish. Live feeds, such as rotifers and *Artemia*, are generally deficient in these EFA (Sargent et al., 1999), so enrichment is required. Failure to provide EFA to larval fish can result in reduced growth, pathological conditions and mortality (Sargent et al., 1995). Few studies, however, have investigated nutritional effects on larval Senegal sole. Morais et al. (2004b) used different enrichment regimes in *Artemia* but failed to demonstrate any clear effect of polyunsaturated fatty acids (PUFA) on larval growth or survival. Nevertheless, an adequate supply of essential PUFA during the early life stages may still affect growth and survival during later stages of development (Howell et al., 1995). Recently we showed that dietary ARA was important in the control of pigmentation in metamorphosing (36 dph) larval Senegal sole (Villalta et al., 2005). The requirement for n-3 polyunsaturated fatty acids (PUFA) in Senegal sole has not been evaluated, but during the study on ARA requirements (Villalta et al., 2005), accumulation of docosapentaenoic acid (22:5n-3, DPA) occurred in larval tissues. DPA is an elongation product from EPA, with the process occurring rapidly in fish. Subsequent elongation, desaturation and chain shortening of DPA to DHA are far more complex and most likely occur at rates not substantial to produce sufficient DHA for requirements (Sargent et al., 1995, 1999). Accumulation of DPA has been observed in other studies on larval marine fishes with inadequate dietary DHA (Izquierdo et al., 1992; Bell et al., 1995; Bransden et al., 2004), and might be indicative that

the concentrations of DHA used in our previous study (1.5–3.3 mg DHA g DM<sup>-1</sup>) were below the requirements for Senegal sole. Thus, this study was designed to investigate the role of dietary DHA above and below our previous concentrations on growth and survival of Senegal sole larvae from 1 to 36 days post hatch (dph) using a dose–response design.

## 2. Material and methods

### 2.1. Experimental emulsions

Commercially available DHA and ARA-rich oils obtained from the heterotrophically grown algae *Cryptocodinium cohnii* (Neuromins®, Martek Bioscience, USA) and fungus *Mortierella alpina* (Vevodar®, DSM Food Specialties, Netherlands) were used. Neuromins® oil gradually replaced olive oil to produce emulsions with 'nil' (DHA-N), 'low' (DHA-L), 'medium' (DHA-M) or 'high' (DHA-H) DHA contents. The components used in the formulation of each emulsion and the major fatty acid compositions in the *Artemia* nauplii are shown in Table 1. Oil mixtures were emulsified with equal amounts of distilled water by homogenising with an Ultra-turrax T25 at high speed for 60 s. The emulsion was then transferred to plastic syringes, the air removed after which the syringes were cooled on ice and kept in a refrigerator (4 °C), in an upright position.

### 2.2. Live food enrichment

Rotifers were enriched in 10 l containers at a density of 500 rotifers ml<sup>-1</sup> for 12 h at 20 °C using 0.1 g l<sup>-1</sup> of all emulsions. After 12 h, the rotifers were gently washed with UV filtered seawater, rinsed for a further 1 min with freshwater to reduce bacterial loads, and subsequently fed to the larvae.

Six-hour-old *Artemia* nauplii (EG strain, INVE) were enriched in 10 l containers at 100 nauplii ml<sup>-1</sup> for 18 h at 26 °C with 0.6 g l<sup>-1</sup> of the emulsions. Enriched metanauplii were thoroughly washed with UV filtered seawater and freshwater (15 min) before feeding to the larvae.

Rotifer and *Artemia* were sampled twice during the experimental period for lipid analysis.

Table 1

Formulation ( $\text{mg g}^{-1}$ ) of the experimental emulsion and the resulting *Artemia* nauplii profile of key fatty acids (% weight of total fatty acids (TFA), mean  $\pm$  S.D.,  $n=2$ )

	DHA-N	DHA-L	DHA-M	DHA-H
<i>Formulation (mg g<sup>-1</sup>)</i>				
Neuromins® oil <sup>a</sup>	0	252	504	757
Vevodar® oil <sup>b</sup>	50	50	50	50
Vegetable oil <sup>c</sup>	0	35	69	103
Olive oil <sup>d</sup>	860	573	287	0
Supplements <sup>e</sup>	90	90	90	90
Total lipids ( $\text{mg g}^{-1}$ DW)	50.3 $\pm$ 4.0	50.2 $\pm$ 5.3	48.6 $\pm$ 6.2	43.5 $\pm$ 7.5
Total FA ( $\text{mg g}^{-1}$ DW)	31.7 $\pm$ 3.5	34.5 $\pm$ 6.0	31.8 $\pm$ 2.8	32.3 $\pm$ 6.3
<i>Fatty acids</i>				
14:0	0.5 $\pm$ 0.1 <sup>w</sup>	1.7 $\pm$ 0.1 <sup>x</sup>	2.9 $\pm$ 0.4 <sup>y</sup>	4.9 $\pm$ 2.1 <sup>z</sup>
16:0	11.5 $\pm$ 1.7	11.8 $\pm$ 1.1	13.0 $\pm$ 0.3	14.5 $\pm$ 0.8
18:0	5.3 $\pm$ 0.1 <sup>x</sup>	4.6 $\pm$ 0.1 <sup>w</sup>	4.9 $\pm$ 0.1 <sup>w</sup>	5.2 $\pm$ 0.3 <sup>x</sup>
Total saturated	18.0 $\pm$ 1.7	18.5 $\pm$ 1.3	21.6 $\pm$ 0.5	25.5 $\pm$ 3.6
16:1n-7	2.4 $\pm$ 0.4	2.2 $\pm$ 0.3	2.3 $\pm$ 0.4	2.5 $\pm$ 0.4
18:1n-9	36.4 $\pm$ 8.1 <sup>xy</sup>	38.1 $\pm$ 7.0 <sup>x</sup>	29.4 $\pm$ 5.4 <sup>xyz</sup>	22.4 $\pm$ 3.0 <sup>w</sup>
20:1n-9	0.5 $\pm$ 0.1	0.5 $\pm$ 0.1	0.4 $\pm$ 0.1	0.3 $\pm$ 0.0
Total monounsaturated	47.1 $\pm$ 7.2 <sup>x</sup>	47.3 $\pm$ 5.9 <sup>x</sup>	38.5 $\pm$ 4.2 <sup>xyz</sup>	31.3 $\pm$ 1.1 <sup>w</sup>
18:2n-6	6.9 $\pm$ 0.5	7.3 $\pm$ 0.4	7.7 $\pm$ 0.6	8.4 $\pm$ 1.2
20:2n-6	0.2 $\pm$ 0.0	0.1 $\pm$ 0.1	0.1 $\pm$ 0.1	0.1 $\pm$ 0.1
20:3n-6	0.1 $\pm$ 0.1	0.1 $\pm$ 0.1	0.2 $\pm$ 0.1	0.8 $\pm$ 0.2
20:4n-6	1.3 $\pm$ 0.4	1.6 $\pm$ 0.3	1.5 $\pm$ 0.4	1.4 $\pm$ 0.1
Total n-6 PUFA	9.0 $\pm$ 0.4	9.4 $\pm$ 0.6	9.9 $\pm$ 0.5	11.2 $\pm$ 0.1
18:3n-3	20.2 $\pm$ 3.7	15.7 $\pm$ 4.0	17.3 $\pm$ 5.4	16.4 $\pm$ 7.9
20:5n-3	1.7 $\pm$ 0.2	1.6 $\pm$ 0.1	1.7 $\pm$ 0.0	1.7 $\pm$ 0.4
22:5n-3	0.0 $\pm$ 0.0	0.0 $\pm$ 0.0	0.0 $\pm$ 0.0	0.1 $\pm$ 0.0
22:6n-3	0.0 $\pm$ 0.0 <sup>x</sup>	4.4 $\pm$ 1.0 <sup>x</sup>	7.7 $\pm$ 2.7 <sup>xyz</sup>	14.7 $\pm$ 1.2 <sup>w</sup>
Total n-3 PUFA	25.8 $\pm$ 5.0	24.8 $\pm$ 4.2	30.0 $\pm$ 4.2	32.1 $\pm$ 4.9
Total PUFA	34.9 $\pm$ 5.4 <sup>w</sup>	34.1 $\pm$ 4.7 <sup>w</sup>	39.9 $\pm$ 4.7 <sup>w</sup>	43.2 $\pm$ 4.7 <sup>w</sup>
n-3/n-6	2.6 $\pm$ 0.7	2.4 $\pm$ 0.5	2.9 $\pm$ 0.4	2.5 $\pm$ 0.8
DHA/EPA	0.0 $\pm$ 0.0 <sup>w</sup>	2.9 $\pm$ 0.5 <sup>w</sup>	4.5 $\pm$ 1.6 <sup>xyz</sup>	10.5 $\pm$ 0.1 <sup>z</sup>
EPA/ARA	1.3 $\pm$ 0.2	1.0 $\pm$ 0.1	1.1 $\pm$ 0.2	1.2 $\pm$ 0.2

Totals include some minor components not shown.

w, x, y, z superscripts denote significant differences among the groups ( $P < 0.05$ ).

<sup>a</sup> Neuromins® oil, Martek Biosciences, Columbia, MD, USA.

<sup>b</sup> Vevodar® oil, DSM Foods Specialties, Delft, Netherlands.

<sup>c</sup> Canola and soybean oil blend.

<sup>d</sup> Lakeland Olives, NSW, Australia.

<sup>e</sup> Supplements: soy lecithin, 70 mg; vitamin E, 20 mg.

### 2.3. Sole larviculture

Senegal sole (*Solea senegalensis*) eggs were obtained from CIFPA "El Toruño" (Cádiz, Spain) from a broodstock held under natural photo and thermo periods. Fertilised eggs were transported by road to Centro de Acuicultura-Instituto de Recerca i Tecnologia Agroalimentàries (CA-IRTA), and larvae hatched during transport. Once at CA-IRTA, larvae were distributed (50 larvae l<sup>-1</sup>) into twelve 35 l, 150

µm mesh baskets distributed among four 1500 l holding tanks. The tanks were connected to a recirculation unit under the conditions described elsewhere (Villalta et al., 2005). Larvae were fed rotifers from 3 to 9 dph at a density of 10 rotifers ml<sup>-1</sup> and *Artemia* nauplii from 5 to 35 dph. Triplicate tanks of larvae were fed each of the experimentally enriched live feeds. The *Artemia* ration was adjusted as in Villalta et al. (2005) to avoid unenriched leftovers (70% body weight, BW, day<sup>-1</sup> from 5 to 15 dph, 20% BW

from 16 to 25 dph, 15% BW from 26 to 30 dph and 7.5% BW from 31 to 35 dph). Live preys were distributed twice per day (9:00 and 16:00 h). Water changes (200%) in the holding tanks were performed daily.

Standard length and dry weight were measured at 1, 4, 6, 10, 12, 15, 20, 30 and 36 dph. Twenty larvae were sampled, placed in beakers and euthanised using a lethal concentration of 3-amino benzoate methane sulphonate ( $1000 \text{ mg l}^{-1}$ , MS 222). Length was measured using a dissecting microscope and image analyser (AnalySIS, SIS GmbH, Germany). Dry weight (DW) determination was carried out by rinsing larvae with distilled water to remove salt and then oven-dried at  $60 \text{ }^\circ\text{C}$  for 24 h. Eye migration during sole metamorphosis was assessed according to the description of Cañavate and Fernandez-Diaz (1999). Data are presented as the relative amount of larvae at each stage of development at the same age. Eye migration index ( $I_{EM}$ ) was calculated according to Solbakken et al. (1999).

Triplicate samples were taken at 1 dph ( $N=490$ ) for initial biochemical analysis. For an assessment of final biochemical composition, 20 larvae  $\text{basket}^{-1}$  were sampled at 36 dph, with the heads, guts and carcasses dissected on ice and kept separately for lipid analysis. The samples were placed directly into chloroform/methanol (2:1, v:v) and stored under nitrogen at  $-20 \text{ }^\circ\text{C}$  until analysis.

Survival and final pigmentation pattern were assessed at the end of the experiment (36 dph).

#### 2.4. Lipid analysis

Total lipids from enriched live food and larval tissues were extracted in chloroform/methanol (2:1, v:v) using the method of Folch et al. (1957), and quantified gravimetrically after evaporation of the solvent under a stream of nitrogen followed by vacuum desiccation overnight. Total lipids were stored in chloroform/methanol (2:1,  $20 \text{ mg ml}^{-1}$ ) containing 0.01% butylated hydroxytoluene (BHT) at  $-20 \text{ }^\circ\text{C}$  until final analysis.

Acid catalysed transmethylation was carried out using the method of Christie (1982). Methyl esters were extracted twice using isohexano/diethyl ether (1:1, v:v), purified on TLC plates (Silica gel 60, VWR, Lutterworth, UK) and analysed by gas-liquid

chromatography on a Thermo ElectronTraceGC (Winsford, UK) instrument fitted with a ZB-Wax capillary column ( $30 \text{ m} \times 0.25 \text{ mm id}$ ; Phenomenex, Macclesfield, UK), using a two-stage thermal gradient from  $50 \text{ }^\circ\text{C}$  (injection temperature) to  $150 \text{ }^\circ\text{C}$  at  $40 \text{ }^\circ\text{C min}^{-1}$  and holding for 5 min at  $225 \text{ }^\circ\text{C}$  after increasing at  $2 \text{ }^\circ\text{C min}^{-1}$ . Hydrogen was used ( $2.0 \text{ ml min}^{-1}$  constant flow rate) as the carrier gas and on-column injection and flame ionisation detection at  $250 \text{ }^\circ\text{C}$  was used. Individual fatty acids were identified by comparison with known standards (Supelco Inc., Madrid) and a well characterised fish oil, and quantified by means of the response factor to the internal standard, 17:0 fatty acid, added prior to transmethylation, using a Chrompack for Windows program (Thermo Electron, Winsford, UK).

#### 2.5. Statistics

The variance of the data is given as standard deviation (S.D.) of the mean of three replicates with differences tested for statistical significance ( $P \leq 0.05$ ) by one-way ANOVA followed by a pairwise multiple comparison of means using Tukey's test. Prior to statistical analysis percentage data were arcsin transformed (Sokal and Rohlf, 1995). A Statgraphics package (Microsoft, Inc.) was used for all statistical analysis.

### 3. Results

#### 3.1. Lipid composition of live prey

Lipid and fatty acid composition of *Artemia* nauplii following enrichment is presented in Table 1. No

Table 2  
Growth and survival of Senegal sole after 36 days after being fed on *Artemia* enriched on experimental emulsions containing 'nil', 'low', 'medium' or 'high' DHA concentrations (DHA-N, -L, -M, -H)

	DHA-N	DHA-L	DHA-M	DHA-H
Final length (mm)	$10.6 \pm 1.3^{\text{bc}}$	$10.2 \pm 1.2^{\text{ab}}$	$10.9 \pm 0.8^{\text{c}}$	$9.8 \pm 1.0^{\text{a}}$
Final dry weight (mg)	$3.0 \pm 0.4$	$2.7 \pm 0.9$	$3.1 \pm 0.3$	$2.4 \pm 0.4$
Survival (%)	$77.0 \pm 8.4$	$85.2 \pm 15.6$	$72.2 \pm 2.0$	$89.8 \pm 8.0$

Mean  $\pm$  S.D. ( $n=3$ ). Different letters indicate significant differences among the groups ( $P < 0.05$ ).



significant differences were found in absolute amounts of total lipid and total fatty acids among the nauplii. Significant differences were detected in the relative content of 14:0, 18:0, 18:1n-9 (oleic acid, OA) and total monounsaturated fatty acids (MUFA) and DHA (total PUFA may also be significant once you check values) reflecting the composition of the emulsions. *Artemia* DHA concentrations were 0.0, 1.5, 2.4 and 4.7 mg g<sup>-1</sup> DW in DHA-N, -L, -M and -H enriched groups, respectively.

### 3.2. Larval performance

Results obtained for growth and survival are shown in Table 2. Larvae fed *Artemia* nauplii enriched with DHA-M emulsion were the longest from 20 dph, and at the trials conclusion were significantly longer ( $P < 0.00001$ ,  $F_{3, 216}$  Fig. 1a) than larvae fed DHA-L and DHA-H. Dry weight was not significantly affected ( $P = 0.190$ ,  $F_{3, 18}$ ) by any dietary treatment at the end of the experiment, although larvae fed

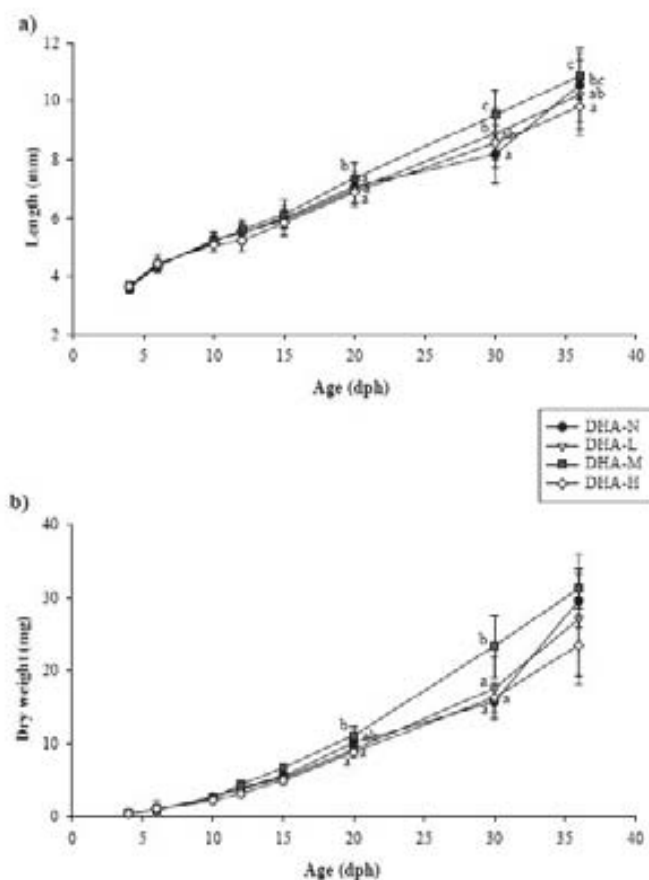


Fig. 1. Temporal changes in length and weight of Senegal sole larvae fed *Artemia* enriched on experimental emulsions containing 'nil', 'low', 'medium' or 'high' DHA concentrations (DHA-N, -L, -M, -H) (mean  $\pm$  S.D.,  $n = 3$ ). Different superscripts denote a significant difference ( $P < 0.05$ ) among dietary treatment at that age.

Table 3

Fatty acid composition (%TFA) of the whole body of newly hatched (1 day post-hatch, dph) and 36 dph larvae of Senegal sole larvae after being fed *Artemia* enriched on experimental emulsions containing 'nil', 'low', 'medium' or 'high' DHA concentrations (DHA-N, -L, -M, -H)

	Initial	DHA-N	DHA-L	DHA-M	DHA-H
Total lipids (mg g <sup>-1</sup> DW)	53.2 ± 5.4	31.9 ± 6.8 <sup>bc</sup>	39.3 ± 1.2 <sup>c</sup>	26.3 ± 3.3 <sup>b</sup>	16.5 ± 1.5 <sup>a</sup>
Total fatty acids (mg g <sup>-1</sup> DW)	46.4 ± 4.3	11.4 ± 3.5	21.8 ± 0.0	14.9 ± 3.9	9.9 ± 3.3
<i>Fatty acid</i>					
14:0	0.9 ± 0.1	0.9 ± 0.1	1.6 ± 0.3	1.6 ± 0.3	1.7 ± 0.3
16:0	21.7 ± 0.1	15.0 ± 0.1 <sup>b</sup>	22.8 ± 4.4 <sup>c</sup>	19.0 ± 0.4 <sup>c</sup>	10.2 ± 0.9 <sup>a</sup>
18:0	10.3 ± 1.7	14.0 ± 1.6	16.0 ± 2.5	13.5 ± 1.2	17.0 ± 5.2
Total saturated	33.9 ± 1.2	30.0 ± 1.9	42.2 ± 7.0	35.4 ± 1.2	29.9 ± 1.0
16:1n-7	3.9 ± 0.2	2.5 ± 0.2	2.0 ± 0.5	1.6 ± 0.2	1.8 ± 0.4
18:1n-9	9.1 ± 0.2	39.5 ± 2.1 <sup>b</sup>	26.9 ± 5.3 <sup>a</sup>	20.5 ± 1.6 <sup>c</sup>	20.9 ± 5.7 <sup>a</sup>
20:1n-9	0.4 ± 0.1	1.8 ± 0.0 <sup>b</sup>	1.2 ± 0.5 <sup>ab</sup>	0.6 ± 0.0 <sup>a</sup>	1.0 ± 0.4 <sup>ab</sup>
Total monounsaturated	17.7 ± 1.6	55.6 ± 2.4 <sup>b</sup>	38.1 ± 7.9 <sup>a</sup>	30.0 ± 2.5 <sup>a</sup>	32.2 ± 9.4 <sup>a</sup>
18:2n-6	0.8 ± 0.0	7.6 ± 0.2 <sup>ab</sup>	5.4 ± 2.4 <sup>ab</sup>	7.0 ± 0.1 <sup>a</sup>	8.2 ± 0.0 <sup>b</sup>
20:2n-6	0.3 ± 0.1	0.2 ± 0.0	0.3 ± 0.1	0.3 ± 0.0	0.4 ± 0.0
20:3n-6	0.8 ± 0.0	0.3 ± 0.1	0.6 ± 0.3	0.5 ± 0.6	0.3 ± 0.0
20:4n-6	3.0 ± 0.0	2.2 ± 0.2	1.5 ± 0.6	2.6 ± 0.3	2.5 ± 0.7
Total n-6 PUFA	6.1 ± 0.5	10.8 ± 0.6	11.4 ± 0.8	11.0 ± 0.6	11.8 ± 1.0
18:3n-3	0.3 ± 0.0	10.2 ± 0.4	8.7 ± 0.9	8.1 ± 0.4	8.8 ± 0.0
20:5n-3	5.5 ± 0.8	0.9 ± 0.0	0.7 ± 0.1	1.3 ± 0.1	1.5 ± 0.4
22:5n-3	5.2 ± 0.6	0.8 ± 0.0	0.9 ± 0.1	1.4 ± 0.2	1.5 ± 0.6
22:6n-3	30.9 ± 3.2	1.5 ± 0.2 <sup>a</sup>	4.5 ± 2.1 <sup>b</sup>	10.5 ± 1.1 <sup>bc</sup>	14.1 ± 3.0 <sup>c</sup>
Total n-3 PUFA	42.3 ± 1.6	15.8 ± 0.1 <sup>a</sup>	12.1 ± 3.5 <sup>ab</sup>	23.6 ± 1.0 <sup>bc</sup>	30.2 ± 5.0 <sup>c</sup>
Total PUFA	48.4 ± 1.2	26.5 ± 0.5 <sup>a</sup>	33.4 ± 4.2 <sup>ab</sup>	34.6 ± 1.4 <sup>ab</sup>	37.7 ± 3.9 <sup>b</sup>
n-3/n-6	6.9 ± 0.7	1.5 ± 0.1	1.4 ± 0.6	2.2 ± 0.1	2.2 ± 0.5
DHA/EPA	6.1 ± 0.2	1.7 ± 0.1 <sup>a</sup>	3.8 ± 1.2 <sup>b</sup>	8.1 ± 0.4 <sup>c</sup>	9.7 ± 3.2 <sup>c</sup>
EPA/ARA	0.7 ± 0.1	0.4 ± 0.0	0.5 ± 0.1	0.5 ± 0.0	0.6 ± 0.0

Mean ± S.D., n = 3.

Totals include some minor components not shown.

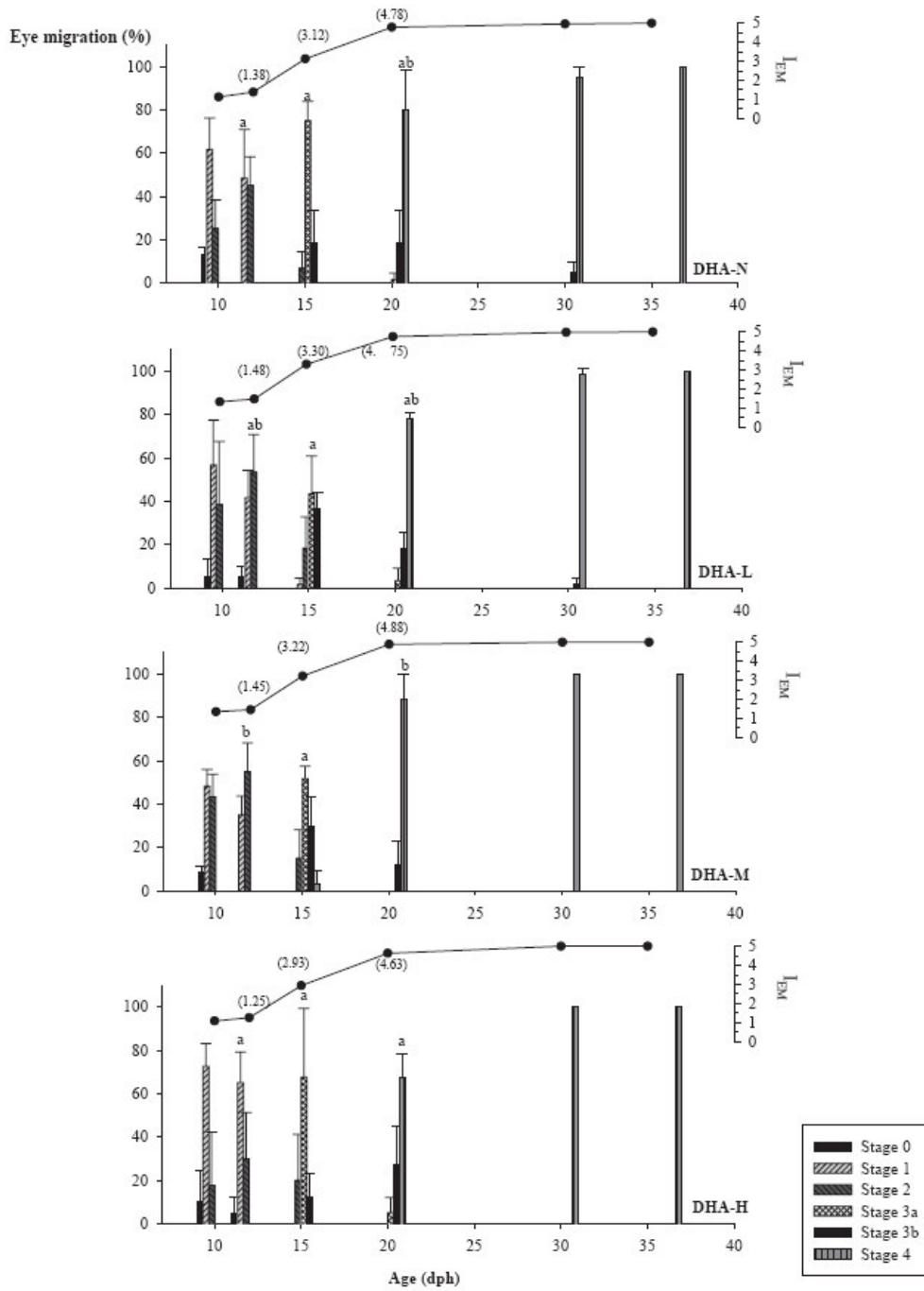
a, b, c superscripts denote significant differences among diets (P < 0.05, F<sub>3, 11</sub>).

DHA-M enriched nauplii were significantly heavier than DHA-L larvae at 20 dph (P < 0.009) and compared to all other treatments at 30 dph (P < 0.006, Fig. 1b). Survival was not significantly affected by any diet (P = 0.265, F<sub>3,10</sub>, Table 3), with an overall, average survival of 81%.

Significant differences (P < 0.05) in the stage of metamorphosis were found between 12 and 20 dph, with DHA-H fed larvae having significantly less advanced stages of eye migration (I<sub>EM</sub> 1.3 and 4.6 at 12 and 20 dph, respectively) than the larvae fed lower

levels of DHA (Fig. 2). Increasing dietary DHA above 2.4 mg g<sup>-1</sup> DW of *Artemia* slowed the degree of eye migration and growth at 20 dph, with the most advanced eye migration occurring for the DHA-M treatment (4.88), followed by DHA-N and DHA-L (4.78 and 4.75, respectively) while larvae fed DHA-H had the least advanced (4.6) eye migration. Eye migration was complete and normal in all the groups at the end of the experiment. No malpigmented fish were recorded at the end of the experiment in any of the four groups.

Fig. 2. Proportion of Senegal sole larvae at stages of eye migration (stages as in Calavate and Fernandez-Diaz, 1999) after being fed *Artemia* enriched with experimental emulsions containing 'nil', 'low', 'medium' or 'high' DHA concentrations (DHA-N, -L, -M, -H). Vertical bars show the percentage ± S.D. of fish at each stage of development. Different superscripts denote significant differences (P < 0.05) among dietary treatments at the same age. Eye migration index (I<sub>EM</sub>) is shown as a line plot above each vertical bar chart. I<sub>EM</sub> values in parentheses are provided where significant differences (P < 0.05) were recorded between dietary treatments at that age.



3.3. Dietary effects on lipid and fatty acid composition of larval tissues

After 36 days of feeding the lipid composition of the whole larvae responded to dietary changes (Table 3). Total lipid content of the fish was significantly lower in DHA-H group (16.5 mg g<sup>-1</sup> DW) compared to all other treatments (31.9, 39.3 and 26.3 mg g<sup>-1</sup> DW in DHA-N, -L and -M groups, respectively). The fatty acid composition (% total fatty acids, %TFA) of the whole fish reflected the composition of the diets. A significantly higher content of DHA was found in DHA-H fed group whereas the lowest was recorded in the DHA-N group. Oleic acid was significantly higher in the DHA-N group (39.5% TFA) compared to all other diets (20.5% to 26.9% TFA).

Total lipid content and fatty acid composition of the heads and carcasses is shown in Tables 4 and 5. Significantly higher lipid content was found in the head of DHA-M fish and in the carcass of DHA-N and -L groups. Fatty acid composition (%TFA) in both tissues responded to dietary changes with most changes occurring in the proportions of DHA, OA and MUFA. DHA content increased in both tissues concomitant with dietary levels and at the expense of a corresponding decrease in the proportion of OA and MUFA. The ratios n-3/n-6 and DHA/EPA also showed significant differences among the groups being higher in the fish fed DHA-M and -H enriched nauplii and lower in the other two groups. Total fatty acid content was not significantly different in the heads of the different groups, although total lipid content was lower in DHA-N and -H groups (Table 4). DHA concentrations

Table 4

Fatty acid composition (%TFA) of the head (including brain and eyes) of Senegal sole larvae after 36 days of being fed *Artemia* enriched on experimental emulsions containing 'nil', 'low', 'medium' or 'high' DHA concentrations (DHA-N, -L, -M, -H)

	DHA-N	DHA-L	DHA-M	DHA-H
Total lipids (mg g <sup>-1</sup> DW)	28.9±7.2 <sup>a</sup>	49.0±16.8 <sup>a,b</sup>	50.3±7.7 <sup>b</sup>	29.4±0.3 <sup>c</sup>
Total fatty acids (mg g <sup>-1</sup> DW)	10.0±4.1	20.1±4.5	15.7±2.4	16.1±6.4
<i>Fatty acid</i>				
14:0	0.8±0.1 <sup>a</sup>	1.2±0.2 <sup>a,b</sup>	1.7±0.3 <sup>b</sup>	1.2±0.4 <sup>a,b</sup>
16:0	18.5±0.4	15.0±0.2	24.4±2.6	18.9±1.2
18:0	13.3±0.6	15.1±2.5	17.3±1.6	15.0±0.6
Total saturated	33.9±0.1 <sup>a</sup>	33.0±3.5 <sup>a,b</sup>	44.7±4.7 <sup>b</sup>	36.3±0.7 <sup>a,b</sup>
16:1n-7	1.7±0.1 <sup>b</sup>	1.3±0.2 <sup>a</sup>	1.1±0.1 <sup>a</sup>	1.1±0.2 <sup>a</sup>
18:1n-9	26.7±0.8 <sup>a,b</sup>	28.4±5.4 <sup>b</sup>	21.3±1.6 <sup>a</sup>	17.8±3.0 <sup>a</sup>
20:1n-9	0.3±0.0	0.3±0.1	0.4±0.2	0.5±0.1
Total monounsaturated	36.6±1.1 <sup>a,b</sup>	38.8±8.1 <sup>b</sup>	29.5±3.3 <sup>a</sup>	30.4±10.0 <sup>a</sup>
18:2n-6	7.3±0.0 <sup>b</sup>	7.6±0.5 <sup>b</sup>	5.4±0.9 <sup>a</sup>	5.5±1.3 <sup>a</sup>
20:2n-6	0.4±0.1	0.4±0.1	0.3±0.1	0.4±0.1
20:3n-6	0.9±0.8	0.6±0.1	0.1±0.1	0.6±0.1
20:4n-6	2.9±0.1	2.7±0.5	1.9±0.6	1.8±0.8
Total n-6 PUFA	12.1±0.8 <sup>b</sup>	11.7±0.2 <sup>b</sup>	7.9±2.0 <sup>a</sup>	8.8±2.1 <sup>a</sup>
18:3n-3	8.5±0.1 <sup>b</sup>	8.6±1.8 <sup>b</sup>	5.4±0.8 <sup>a</sup>	5.1±2.1 <sup>a</sup>
20:5n-3	1.4±0.1	1.3±0.2	0.9±0.4	1.7±0.3
22:5n-3	1.6±0.1	1.6±0.4	1.0±0.5	1.5±0.1
22:6n-3	3.3±0.3 <sup>a</sup>	8.2±1.6 <sup>b</sup>	9.1±3.9 <sup>b,c</sup>	14.5±5.0 <sup>c</sup>
Total n-3 PUFA	17.5±0.4	22.2±0.1	17.9±6.1	24.7±7.3
Total PUFA	29.5±1.3	33.7±0.4	25.8±8.0	33.4±9.4
n-3/n-6	1.4±0.1 <sup>a</sup>	1.9±0.1 <sup>a,b</sup>	2.2±0.2 <sup>b</sup>	2.8±0.2 <sup>b</sup>
DHA/EPA	2.4±0.1 <sup>a</sup>	6.2±0.3 <sup>b</sup>	10.6±0.2 <sup>c</sup>	8.9±4.4 <sup>b,c</sup>
EPA/ARA	0.5±0.0	0.5±0.0	0.5±0.0	1.1±0.7

Mean ± S.D., n=3.

Totals include some minor components not shown.

a, b, c letters denote significant differences (P<0.05, F<sub>3, 11</sub>)

Table 5

Fatty acid composition (%TFA) of the carcass (excluding the head and the gut) of Senegal sole larvae after 36 days of being fed *Artemia* enriched on experimental emulsions containing 'nil', 'low', 'medium' or 'high' DHA concentrations (DHA-N, -L, -M, -H)

	DHA-N	DHA-L	DHA-M	DHA-H
Total lipids (mg g <sup>-1</sup> DW)	41.8 ± 5.9 <sup>b</sup>	34.6 ± 8.0 <sup>b</sup>	13.6 ± 2.4 <sup>a</sup>	17.5 ± 2.7 <sup>a</sup>
Total fatty acids (mg g <sup>-1</sup> DW)	20.6 ± 2.2 <sup>c</sup>	11.7 ± 5.3 <sup>ab</sup>	5.4 ± 0.5 <sup>a</sup>	10.4 ± 1.7 <sup>b</sup>
<i>Fatty acid</i>				
14:0	0.7 ± 0.1 <sup>a</sup>	1.3 ± 0.1 <sup>ab</sup>	1.5 ± 0.2 <sup>ab</sup>	1.6 ± 0.1 <sup>b</sup>
16:0	16.5 ± 8.9	19.5 ± 2.6	18.0 ± 1.6	19.0 ± 3.5
18:0	12.9 ± 0.0	13.6 ± 1.5	13.1 ± 1.7	15.3 ± 4.2
Total saturated	31.0 ± 8.1	35.8 ± 4.4	33.7 ± 3.6	37.1 ± 8.1
16:1n-7	1.7 ± 0.5	1.8 ± 0.2	0.7 ± 0.0	1.5 ± 0.1
18:1n-9	33.7 ± 0.4 <sup>c</sup>	26.0 ± 3.2 <sup>bc</sup>	20.7 ± 1.4 <sup>b</sup>	16.8 ± 0.3 <sup>a</sup>
20:1n-9	0.8 ± 0.5	1.0 ± 0.3	0.6 ± 0.1	0.6 ± 0.0
Total monounsaturated	47.0 ± 0.4 <sup>c</sup>	37.4 ± 5.3 <sup>bc</sup>	30.4 ± 1.4 <sup>b</sup>	25.9 ± 0.4 <sup>a</sup>
18:2n-6	9.6 ± 0.0 <sup>b</sup>	6.8 ± 1.3 <sup>a</sup>	7.3 ± 0.1 <sup>a</sup>	7.7 ± 0.8 <sup>a</sup>
20:2n-6	0.4 ± 0.0	0.3 ± 0.0	0.4 ± 0.0	0.4 ± 0.1
20:3n-6	0.7 ± 0.1	0.3 ± 0.4	0.7 ± 0.6	0.3 ± 0.0
20:4n-6	3.3 ± 0.1	2.3 ± 1.0	2.6 ± 0.2	2.6 ± 0.5
Total n-6 PUFA	13.6 ± 0.1 <sup>b</sup>	10.0 ± 2.9 <sup>a</sup>	11.6 ± 0.9 <sup>a</sup>	11.4 ± 1.3 <sup>a</sup>
18:3n-3	13.6 ± 0.1 <sup>b</sup>	7.8 ± 1.9 <sup>a</sup>	8.5 ± 0.4 <sup>a</sup>	8.2 ± 1.5 <sup>a</sup>
20:5n-3	1.6 ± 0.1	1.1 ± 0.5	1.5 ± 0.1	1.5 ± 0.4
22:5n-3	1.2 ± 0.0	1.1 ± 0.7	1.4 ± 0.2	1.6 ± 0.4
22:6n-3	2.2 ± 0.0 <sup>a</sup>	4.8 ± 0.1 <sup>b</sup>	10.3 ± 0.8 <sup>c</sup>	12.3 ± 3.5 <sup>d</sup>
Total n-3 PUFA	22.0 ± 0.1	16.8 ± 4.5	24.3 ± 1.4	25.8 ± 6.3
Total PUFA	36.6 ± 0.0	38.1 ± 6.3	35.8 ± 2.3	37.1 ± 7.6
n-3/n-6	1.5 ± 0.0 <sup>a</sup>	1.7 ± 0.2 <sup>ab</sup>	2.1 ± 0.1 <sup>b</sup>	2.3 ± 0.3 <sup>b</sup>
DHA/EPA	1.4 ± 0.1 <sup>a</sup>	4.4 ± 0.6 <sup>b</sup>	6.7 ± 0.2 <sup>c</sup>	8.2 ± 0.0 <sup>d</sup>
EPA/ARA	0.5 ± 0.0	0.5 ± 0.0	0.6 ± 0.1	0.6 ± 0.1

Mean ± S.D., n=3.

Totals include some minor components not shown.

a, b, c, d superscripts denote significant differences ( $P < 0.05$ ,  $F_{3, 11}$ ).

were 0.3, 1.6, 1.4 and 2.3 mg g<sup>-1</sup> DW in the heads of the fish of DHA-N, -L, -M and -H groups, respectively. The specific accumulation of DHA in the lipids of the head was similar in the groups fed DHA-L and -M enriched *Artemia* with a further increase at higher dietary DHA levels. In the case of the carcass significant differences were found in the total fatty acid content with the lowest amount found in DHA-N fish. DHA concentrations were 0.5, 0.6, 0.6 and 1.3 mg g<sup>-1</sup> DW in DHA-N, -L, -M and -H groups, respectively whereas OA showed a completely opposite trend and the concentrations were 6.9, 3.0, 1.1 and 1.7 mg g<sup>-1</sup> DW, respectively.

#### 4. Discussion

Senegal sole larvae are able to grow and survive on *Artemia* nauplii absent of DHA, but containing other n-3 PUFA, up to 36 dph. This suggests Senegal sole have a low or negligible requirement for this fatty acid. These results are supported by the work of Morais et al. (2004b), who found that in multiple trials on Senegal sole larvae up to 38 dph, that larvae grew equally well regardless of the *Artemia* DHA concentration (0.1–4.9 mg g<sup>-1</sup> DW). Similar results have also been obtained for larvae of other flatfish, including Japanese flounder (Izquierdo et al., 1992), common sole (Tzoumas, 1988) and plaice (Dickey-Collas and Geffen, 1992), which do not require DHA in the diet if adequate EPA is present. Conversely, other flatfish like turbot (Le Milinaire, 1984; Bell et al., 1985) or yellowtail flounder (Copeman et al., 2002) with longer larval stages than Senegal sole, need exogenous supplies of DHA, ARA and EPA, for normal growth, and high mortalities are recorded with low dietary DHA levels. The low requirement for DHA observed in this experiment might explain the ease of culture of this species on most types of *Artemia*, which are usually considered to be 'deficient' in EFA (Sargent et al., 1999), and higher survival.

Metamorphosis of Senegal sole cultured at 20 ± 1 °C is an early and rapid event. It is initiated at 10 dph when larvae start moving towards the bottom of the tanks, and changes in the body morphology to that of a "flat" fish, and finish at 20–25 dph when the migration of the eye is completed. During this period of larval development, growth and ingestion rates together with oxygen consumption decrease (Parra, 1998). Once metamorphosis is completed (approximately 1000 µg DW), these parameters increase again as well as the energy used for metabolism whereas the energy used for growth decrease significantly (Parra, 1998). After metamorphosis flatfish use most of the energy for swimming, foraging, feeding and avoiding possible predators by burying in the sandy bottom (Miyazaki et al., 2000). According to Parra (1998) and Youson (1988), in the stages prior to metamorphosis, body lipid increases as an energy reserve during metamorphosis to compensate for the reduction in prey consumption during this period. We have not analysed the total lipid content of the larvae at different stages of development, only at the conclu-

sion once the fish become juveniles. However, it might be the case that during the first 10 days of larval development, total lipid, n-3 PUFA and DHA requirements are different to those needed post-metamorphosis. Intrinsically, this may be due to the varied distribution of flatfish during their development.

Pelagic, carnivorous larval fish have access to abundant DHA sources in the pelagic food chain (Kainz et al., 2004), and likewise, pelagic wild Senegal sole larvae prior to metamorphosis (3 to 8 mm total length; Drake and Arias, 1993) have been found to predominantly feed on copepods (80.3% stomach content) and bivalve veliger (13.4% stomach content) that are well known to be rich in n-3 PUFA including DHA (Holland, 1978; Sargent and Falk-Peterson, 1988; Morehead et al., 2005). Following metamorphosis and settlement, benthic dwelling flatfish are exposed mainly to an abundance of diatom algae that are rich in EPA and 16:0 fatty acids (Kates and Volcani, 1966; Graeve et al., 1997), and also feed on polychaetes (75% stomach content, Cabral, 2000) including *Heuliste* sp. (64.6% stomach content) which are also rich in EPA (24.4% TFA, Copeman and Parrish, 2003). Subsequently, despite the initial availability and consumption of DHA in the wild, Senegal sole larvae are well adapted to utilising EPA as its primary source of n-3 PUFA in the long term, which may explain the negligible requirement for DHA in this study so long as dietary EPA was provided. A possible, higher requirement for dietary DHA pre-metamorphosis was not identified here, perhaps as sole larvae fed DHA deficient *Artemia* nauplii preferentially conserved endogenous reserves of DHA to allow successful metamorphosis. Indeed, during starvation Senegal sole larvae use triacylglycerols as the main energy substrate with a large depletion of saturated fatty acids (SFA) and MUFA and conservation of DHA and ARA (Mourente and Vazquez, 1996).

During longer term studies, or during times of increased nutrient demands such as metamorphosis (e.g. Dhert et al., 1990; Howell et al., 1995), biological effects of increasing dietary DHA, such as improved growth and survival, become clearer in comparison to studies investigating DHA requirements in larvae from first-feeding (Bransden et al., 2004; Bransden et al., 2005). While evaluation of graded DHA diets in longer term studies on Senegal

sole is justifiable, we hypothesise that exposure of Senegal sole predominantly to EPA rather than DHA in the wild post-settlement would suggest dietary DHA requirements remain negligible in post-larvae and juvenile Senegal sole unlike other, pelagic fishes.

Senegal sole show a continuous feeding if food is available and a rapid and efficient larval development (Yúfera et al., 1999). Thus, in this trial conducted at  $20 \pm 1$  °C newly hatched larvae are able to complete metamorphosis and attain benthic settling in less than 3 weeks with low mortality. The feeding physiology and behaviour of developing larvae contribute to that success in reaching the juvenile stage (Sarasquete et al., 1996; Morais et al., 2004a). In the present experiment, daily growth rate in weight from 2 to 15 dph varied between  $21.7 \pm 0.8\%$  day<sup>-1</sup> of DHA-H group and  $24.0 \pm 1.0\%$  day<sup>-1</sup> of DHA-M group. After metamorphosis (15 to 35 dph) once the fish became benthic, the growth rate decreased significantly in all the experimental groups ( $7.6 \pm 1.1$ ,  $7.2 \pm 1.3$ ,  $7.0 \pm 0.6$  and  $7.0 \pm 0.6\%$  day<sup>-1</sup> for groups DHA-N, -L, -M and -H, respectively). Interestingly, larvae fed the DHA-H diet generally had the lowest growth rates despite this diet containing the highest concentration of DHA. Saturated and monounsaturated fatty acids, particularly 16:0, 18:1n-9, 20:1n-9 and 22:1n-11 are easily catabolized in fish to produce energy, while DHA is not easily catabolized via  $\beta$ -oxidation (Sargent et al., 2002). Subsequently an increase in dietary DHA and a reduction in monounsaturated fatty acids, particularly 18:1n-9, in larvae fed DHA-H compared to the other diets, may have led to reduced energy availability and subsequently reduced growth and metamorphosis. This point, however, requires further investigation. The differences in growth during and following metamorphosis have also been observed in a previous study (Villalta et al., 2005) although in that case growth rate after metamorphosis was higher and varied between 9.4 and 11% day<sup>-1</sup>. These differences in growth between experiments can be explained in terms of larval survival and final density in the rearing tanks (17 to 20 larvae l<sup>-1</sup> in the previous experiment compared to 36 to 45 larvae l<sup>-1</sup> in the present) and prey availability (around 400 nauplii per larva in the previous experiment compared to 270–330 nauplii per larva in the present).

The whole body fatty acid composition of initial larvae (1 dph) was similar to other results for Senegal

sole larvae reported by Vazquez et al. (1994) and Villalta et al. (2005). Fatty acid proportions in the whole body, head and carcass of Senegal sole larvae closely matched proportions in the feeds. In particular DHA increased in all tissues with increasing dietary amounts. Interestingly DHA proportions in whole larval bodies were substantially lower in larvae at 36 dph compared to those recorded in larvae at 1 dph (30.9%TFA). All diets were essentially void of DPA, yet in all tissues close to or more than 1% of this fatty acid was found. This may represent residual amounts of this fatty acid from yolk-sac reserves (initial larvae contained 5.2% TFA), retro-conversion of DHA to EPA by the *Artemia* nauplii, or possible elongation of EPA by the larvae. We previously hypothesised that accumulation of DPA in Senegal sole tissue might indicate an inadequate supply of exogenous DHA (Villalta et al., 2005), although a lack of any supporting biological data, and a life-history adapted to low exogenous DHA supplies, suggest that the DPA contents are probably from endogenous reserves or via *Artemia* metabolism.

ARA decreases (otherwise constant in diet) in the head as more dietary DHA was provided, showing a competitive interaction already found by Harel et al. (2000) in white bass larvae. Given that both n-3 and n-6 families share the same metabolic pathways of degradation, elongation and desaturation, dietary ARA supplementation especially in case of DHA deficiency implies that more limiting resources of desaturation and elongation will be freed for the production and preservation of tissue DHA.

It should not be forgotten that lipids provide the "fuel" for growth in the form of SFA and MUFA (Sargent et al., 2002). A balance between the PUFA required for functional integrity of cell membranes and the less unsaturated fatty acids required for energy is vitally important (Sargent et al., 1995). In the present experiment, diets with medium and high levels of DHA contained low levels of OA and MUFA. These fatty acids are preferentially stored in the triacylglyceride fraction of the total lipid, which effectively acts as the lipid reserves. Alternatively DHA is stored in the polar lipid fraction. As a consequence, fish fed low DHA enriched nauplii had 2-fold more lipid body reserves and up to 6-fold higher OA content compared to fish fed medium and high levels of DHA.

In brain tissue and retinal tissue, DHA is the most abundant fatty acid (Mourete, 2003). Dietary deficiency of DHA is known to cause impaired visual performance (Bell et al., 1995), reduced feeding (Bransden et al., in press) and abnormal schooling behaviour (Masuda et al., 2001) in fish larvae that might not be rectified in later life. We did not measure the ability for Senegal sole larvae to feed on the live prey to determine possible treatment effects, although a lack of any correlation between dietary DHA and growth probably indicates low dietary DHA did not impair vision and subsequent feeding. However, Senegal sole larvae are able to feed at night (Dmke and Arias, 1993) indicating that prey perception may not only occur by visual means, so further work is required to establish the role of DHA in sole vision.

In summary, a dose–response design investigating the effect of dietary DHA on larval Senegal sole performance failed to highlight any significant trends between dietary DHA and larval performance to 36 dph. Results indicated that, like several other marine flatfish, dietary DHA requirements during the larval phase are low in comparison to more pelagic, carnivorous marine fish. We hypothesise that this may be due to the natural distribution of flatfish and the relative abundance or shortage of essential fatty acids in the benthos, and possibly that Senegal sole can sufficiently meet n-3 PUFA requirements through relatively minor amounts of EPA. This will be the focus of future experiments on this species. Finally, low requirements, especially for DHA, make the Senegal sole an ideal candidate for aquaculture due to the need to use live feeds such as *Artemia* which, for other fish species, often have inadequate n-3 PUFA compositions.

#### Acknowledgements

Senegal sole eggs were generously donated by CIFPA "El Toruño" (Cádiz, Spain). Neuromins<sup>®</sup> oil was provided by Martek Biosciences, UAS. Vevodar<sup>®</sup> oil was provided by DSM Food Specialties, Netherlands. Olive oil was provided by Lakelands Olives (NSW, Australia). MV would like to thank the financial support provided by Generalitat de Catalunya (DURSI scholarship). Funding was partially provided to AE by the Spanish Ministries of Science

and Education (INIA project ACU-02-006) and Agriculture, Fisheries and Food (Jacumar), and by the Generalitat de Catalunya (CRA). MPB was financially supported by the Australian Aquafin CRC. We owe thanks to J. Canoura, G. Macià and M. Monlló for their help during larval rearing, and to J. Dick for analytical assistance. This investigation was supported through an award to AE from the European Union Access to Research Infrastructures (ARI) Action of the Improving Human Potential (IHP) Programme (contract HPRI-CT-2001-00180).

References

Anguis, V., Cañavate, J.P., 2005. Spawning of captive Senegal sole (*Solea senegalensis*) under a naturally fluctuating temperature regime. *Aquaculture* 243, 133–145.

Bell, M.V., Henderson, R.J., Pirie, B.J.S., Sargent, J.R., 1985. Effects of dietary polyunsaturated fatty acid deficiencies on mortality, growth and gill structure in the turbot, *Scophthalmus maximus*. *J. Fish Biol.* 26, 181–191.

Bell, M.V., Bary, R., Navarro, J.C., Sargent, J.R., Dick, J.R., 1995. Dietary deficiency of docosahexaenoic acid impairs vision at low light intensities in juvenile herring (*Clupea harengus* L.). *Lipids* 30, 443–449.

Bransden, M.P., Dunstan, G.A., Battaglene, S.C., Cobcroft, J.M., Morehead, D.T., Kolkovski, S., Nichols, P.D., 2004. Influences of dietary n-3 long chain PUFA on body concentrations of 20:5n-3, 22:5n-3 and 22:6n-3 in larvae of a marine teleost fish from Australian waters, the striped trumpeter (*Lateis lineata*). *Lipids* 39, 215–222.

Bransden, M.P., Battaglene, S.C., Morehead, D.T., Dunstan, G.A., Nichols, P.D., 2005. Effect of dietary 22:6n-3 on growth, survival and tissue fatty acid profile of striped trumpeter (*Lateis lineata*) larvae fed enriched *Artemia*. *Aquaculture* 243, 331–344.

Bransden, M.P., Cobcroft, J.M., Battaglene, S.C., Morehead, D.T., Dunstan, G.A., Nichols, P.D., Kolkovski, S., in press. Dietary 22:6n-3 alters gut and liver structure and behaviour in larval striped trumpeter (*Lateis lineata*). *Aquaculture*.

Cabeal, H.N., 2000. Comparative feeding ecology of sympatric *Solea solea* and *S. senegalensis*, within the nursery areas of the Tagus estuary, Portugal. *J. Fish Biol.* 57, 1550–1562.

Cañavate, J.P., Fernandez-Diaz, C., 1999. Influence of co-feeding larvae with live and inert diets on weaning the sole *Solea senegalensis* onto commercial dry feeds. *Aquaculture* 174, 255–263.

Christie, W.W., 1982. *Lipid Analysis*. Pergamon, Oxford, UK, 207 pp.

Copeman, L.A., Parrish, C.C., 2003. Marine lipids in a cold coastal ecosystem: Gilbert Bay, Labrador. *Mar. Biol.* 143, 1213–1227.

Copeman, L.A., Parrish, C.C., Brown, J.A., Harel, M., 2002. Effects of docosahexaenoic, eicosapentaenoic, and arachidonic acids on the early growth, survival, lipid composition and pigmentation of yellowtail flounder (*Limanda ferruginea*): a live food enrichment experiment. *Aquaculture* 210, 285–304.

Dhart, P., Lavens, P., Duray, M., Sorgeloos, P., 1990. Improved larval survival at metamorphosis of Asian seabass (*Lateis niloticus*) using omega 3-HUFA-enriched live food. *Aquaculture* 90, 63–74.

Dickey-Collas, M., Geffen, A.J., 1992. Importance of the fatty acids 20:5n3 and 22:6n3 in the diet of plaice (*Pleuronectes platessa*) larvae. *Mar. Biol.* 113, 463–468.

Dimis, M.T., Ribeiro, L., Soares, F., Samsquete, C., 1999. A review on the cultivation potential of *Solea senegalensis* in Spain and in Portugal. *Aquaculture* 176, 27–38.

Drake, P., Arias, A.M., 1993. Larval feeding habits and diel rhythms of four species of marine fish in a tidal creek of Cadiz bay (Spain). In: Walther, B.T., Fyhn, H.J. (Eds.), *Physiological and Biochemical Aspects of Fish Development*. Univ. Bergen, Norway, pp. 153–159.

Folch, J., Lees, N., Sloane-Stanley, G.H., 1957. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J. Biol. Chem.* 226, 497–509.

Graeve, M., Kammer, G., Piepenburg, D., 1997. Lipids in Arctic benthos: does the fatty acid and alcohol composition reflect feeding and trophic interactions? *Polar Biol.* 18, 53–61.

Harel, M., Lund, E., Gavasso, S., Herbert, R., Place, A.R., 2000. Modulation of arachidonate and docosahexaenoate in *Morone chrysops* larval tissues and the effect on growth and survival. *Lipids* 35, 1269–1280.

Holland, D.L., 1978. Lipid reserves and energy metabolism in the larvae of benthic marine invertebrates. In: Malins, D.C., Sargent, J.R. (Eds.), *Biochemistry and Biophysical Perspectives in Marine Biology*, vol. 4. Academic Press, NY, pp. 85–129.

Howell, B.R., Beauf, T.W., Hallam, J.D., 1995. The effect of diet quality on the low-temperature tolerance of juvenile sole, *Solea solea* (L.). *ICLCS CM 1995/E*, vol. 13, 9 pp.

Izquierdo, M.S., Arakawa, T., Takeuchi, T., Haroun, R., Watanabe, T., 1992. Effect of n-3 HUFA levels in *Artemia* on growth of larval Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*). *Aquaculture* 105, 73–82.

Kainz, M., Arts, M.T., Mazumder, A., 2004. Essential fatty acids in the planktonic food web and their ecological role for higher trophic levels. *Limnol. Oceanogr.* 49, 1784–1793.

Kates, K., Volkani, B.E., 1966. Lipid components of diatoms. *Biochim. Biophys. Acta* 116, 264–278.

Le Milinaire, C., 1984. Etude du besoin en acides gras essentiels pour la larve de turbot (*Psetta maxima* L.) pendant la phase d'alimentation avec le rotifer *Brachionus plicatilis* (O.F. Muller). These 3<sup>ème</sup> Cycle/Univ. Bretagne Occidentale. 167 pp.

Masuda, R., Zeimann, D.A., Ostrowski, A.C., 2001. Patchiness formation and development of schooling behaviour in pacific threadfin *Polydactylus sexfilis* reared with different dietary highly unsaturated fatty acid contents. *J. World Aquac. Soc.* 32, 309–316.

Miyazaki, T., Masuda, R., Furuta, S., Tsukamoto, K., 2000. Feeding behaviour of hatchery-reared juveniles of the Japanese flounder following a period of starvation. *Aquaculture* 190, 129–138.



- Moraís, S., Laccuisse, M., Conceição, L.E.C., Dinis, M.T., Ronnestad, I., 2004a. Ontogeny of the digestive capacity of Senegal sole (*Solea senegalensis*), with respect to digestion, absorption and metabolism of amino acids from *Artemia*. Mar. Biol. 145, 243–250.
- Moraís, S., Narciso, L., Dores, E., Pousao-Ferreira, P., 2004b. Lipid enrichment for Senegalese sole (*Solea senegalensis*) larvae: effect on larval growth, survival and fatty acid profile. Aquac. Int. 12, 281–298.
- Morehead, D.T., Battaglione, S.C., Metillo, E.B., Bransden, M.P., Dunstan, G.A., 2005. Copepods as a live feed for striped trumpeter *Lutris lineata* larvae. In: Lee, C.S., O'Bryen, P., Marcus, N. (Eds.), Copepods in Aquaculture. Blackwell Publishing, Ames, IA.
- Mourente, G., 2003. Accumulation of DHA (docosahexaenoic acid; 22:6n-3) in larval and juvenile fish brain. In: Browman, H.I., Skiftesvik, A.B. (Eds.), The Big Fish Bang. Proceedings of the 26th Annual Larval Fish Conference. Institute of Marine Research, Bergen, Norway, pp. 239–248.
- Mourente, G., Vazquez, R., 1996. Changes in the content of total lipid, lipid classes and their fatty acids of developing eggs and unfed larvae of the Senegal sole, *Solea senegalensis* Kaup. Fish Physiol. Biochem. 15, 221–235.
- Para, G., 1998. Fisiología y balance energético durante el desarrollo larviano de peces marinos (*Solea senegalensis* Kaup y *Spicara smaris* Linneo) en cultivo. Tesis doctoral, Universidad de Cádiz, 176 pp.
- Sarasquete, M.C., González de Canales, M.L., Arellano, J.M., Muñoz-Cueto, J.A., Ribeiro, L., Dinis, M.T., 1996. Histochemical aspects of the yolk-sac and digestive tract of larvae of the Senegal sole, *Solea senegalensis* (Kaup, 1858). Histo. Histo-pathol. 11, 881–888.
- Sargent, J.R., Falk-Peterson, S., 1988. The lipid biochemistry of calanoid copepods. Hydrobiologia 167/168, 101–114.
- Sargent, J.R., Bell, J.G., Bell, M.V., Henderson, R.J., Tocher, D.R., 1995. Requirement criteria for essential fatty acids. J. Appl. Ichthyol. 11, 183–198.
- Sargent, J., McEvoy, L., Estévez, A., Bell, G., Bell, M., Henderson, J., Tocher, D., 1999. Lipid nutrition of marine fish during early development: current status and future directions. Aquaculture 179, 217–229.
- Sargent, J.R., Tocher, D.R., Bell, J.G., 2002. The lipids. In: Halver, J.E., Hardy, R.W. (Eds.), Fish Nutrition. Academic Press, San Diego, CA, USA, pp. 181–257.
- Sokal, R.R., Rohlf, F.J., 1995. Biometry. Freeman, NY, USA, 859 pp.
- Sølbakken, J.S., Norberg, B., Watanabe, K., Pittman, K., 1999. Thyroxine as a mediator of metamorphosis of Atlantic halibut, *Hippoglossus hippoglossus*. Environ. Biol. Fishes 56, 53–65.
- Tzoumas, A.P., 1988. The nutritional value of freshly hatched and enriched *Artemia* nauplii for sole larvae (*Solea solea*), from the standpoint of their polyunsaturated fatty acid content. Master thesis, Institute of Aquaculture, University of Stirling, 146 pp.
- Vazquez, R., Gonzalez, S., Rodriguez, A., Mourente, G., 1994. Biochemical composition and fatty acid content of fertilized eggs, yolk sac stage larvae and first feeding larvae of the Senegal sole (*Solea senegalensis* Kaup). Aquaculture 119, 273–286.
- Villalta, M., Estévez, A., Bransden, M.P., 2005. Arachidonic acid enriched live prey induces albinism in Senegal sole (*Solea senegalensis*) larvae. Aquaculture 245, 193–209.
- Youson, J.H., 1988. Fish metamorphosis. In: Hoar, W.S., Randall, D.J. (Eds.), Fish Physiology, vol. XI, Part B. Academic Press, New York, pp. 135–196.
- Yúfera, M., Para, G., Santiago, R., Carrascosas, M., 1999. Growth, carbon, nitrogen and caloric content of *Solea senegalensis* (Pisces: Soleidae) from egg fertilization to metamorphosis. Mar. Biol. 134, 43–49.
- Zarza, C., Padrós, F., Estévez, A., Crespo, S., Furones, M.D., 2003. New fish species for aquaculture, old pathological problems: the case of *Solea* sp. Proc. 11th European Assoc. Fish Pathologist, St Julians, Malta.