

**IMPLICACIONES
BIOLÓGICAS DE LA
INDUCCIÓN A LA
TRIPLOIDÍA
EN RODABALLO
(*Scophthalmus maximus*)**

Jorge Hernández Urcera

PROGRAMA DE DOCTORADO EN ACUICULTURA

SANTIAGO DE COMPOSTELA

2015



**IMPLICACIONES
BIOLÓGICAS DE LA
INDUCCIÓN A LA
TRIPLOIDÍA
EN RODABALLO
(*Scophthalmus maximus*)**

Fdo.:

Jorge Hernández Urcera

PROGRAMA DE DOCTORADO EN ACUICULTURA

SANTIAGO DE COMPOSTELA

2015





AUTORIZACIÓN DE LOS DIRECTORES

Dña. Rosa Cal Rodríguez
Investigadora Titular del Instituto Español de Oceanografía, Centro Oceanográfico de Vigo

D. Paulino Martínez Portela
Catedrático del Departamento de Genética de la Facultad de Veterinaria de la Universidad de Santiago de Compostela

Como Directores de la Tesis Doctoral titulada: Implicaciones biológicas de la inducción a la triploidía en rodaballo (*Scophthalmus maximus*).

Presentada por D. Jorge Hernández Urcera
Alumno del Programa de Doctorado en Acuicultura

Autorizan la presentación de la tesis indicada, considerando que reúne los requisitos exigidos en el artículo 34 del reglamento de Estudios de Doctorado, y que como Directores de la misma no incurrir en las causas de abstención establecidas en la ley 30/1992.

Fdo.: Dr. Rosa Cal Rodríguez

Fdo.: Prof. Dr. Paulino Martínez Portela





Dña. Rosa Cal Rodríguez, Investigadora Titular del Instituto Español de Oceanografía, Centro Oceanográfico de Vigo y D. Paulino Martínez Portela, Catedrático del Departamento de Genética de la Facultad de Veterinaria de la Universidad de Santiago de Compostela, como Directores de la Tesis Doctoral titulada: Implicaciones biológicas de la inducción a la triploidía en rodaballo (*Scophthalmus maximus*).

Por la presente **DECLARAN:**

Que la tesis presentada por D. Jorge Hernández Urcera es idónea para ser presentada, de acuerdo con el artículo 41 del *Reglamento de Estudios de Doctorado*, por la modalidad de compendio de ARTICULOS, en los que el doctorando tuvo participación en el peso de la investigación y su contribución fue decisiva para llevar a cabo este trabajo.

Y que está en conocimiento de los coautores, tanto doctores como no doctores, participantes en los artículos, que ninguno de los trabajos reunidos en esta tesis será presentado por ninguno de ellos en otra Tesis Doctoral, lo que firmamos bajo nuestra responsabilidad.

Santiago de Compostela, a 1 de septiembre de 2015.

Fdo.: Dr. Rosa Cal Rodríguez

Fdo.: Prof. Dr. Paulino Martínez Portela



A mis padres







“Dejamos de temer aquello que se ha aprendido a entender”

Marie Curie



Agradecimientos

A lo largo de estos años han sido muchas las personas que me han apoyado y ayudado, sin las cuales, ya sea por un motivo profesional o personal, no hubiera sido posible la realización de este trabajo. Por lo que quiero aprovechar la oportunidad para mostrar mis agradecimientos a todas ellas.

En primer lugar, deseo expresar mi más sincero agradecimiento a mis directores de tesis. A la Dr.^a Rosa Cal que, tras haberme brindado la posibilidad de iniciar esta tesis hace ya más de 7 años, me ha mostrado su apoyo incondicional en todo momento. Sin su fe inicial en mí y su paciencia a lo largo de este periodo nada hubiera sido posible. Gracias por haberme dejado la autonomía necesaria para trabajar, pero orientándome y aconsejándome cuando lo he necesitado. Espero haberme contagiado de ese incombustible entusiasmo por la investigación. Al Prof. Dr. Paulino Martínez por su gran ayuda siempre que la he necesitado y por la hospitalidad con la que me ha recibido en las múltiples estancias que he realizado en el Departamento de Genética de la USC en Lugo.

Mi gratitud a todos los compañeros de la Planta de Cultivos Marinos del Centro Oceanográfico de Vigo, muy especialmente a Castora y Chus, quienes me han ayudado de forma inestimable con los cultivos larvarios y los continuos muestreos de rodaballo. Gracias también a Lidia, que siempre me animó a continuar a pesar de las adversidades. A Tito, que me brindó la posibilidad de hacer los cursos de doctorado cuando llegué al IEO. A Pepe, quien accedió a tutelar mi DEA y con quien realicé mis primeros experimentos en el campo de la acuicultura. Gracias también a Manu por los ánimos en la recta final de la tesis y por las apasionantes sesiones de *brainstorming* sobre futuros artículos de *Nature*. Muchas gracias al equipo de mantenimiento y apoyo técnico por su eficacia a la hora de solucionar los problemas técnicos y por el cuidado diario de los rodaballos. Quedo agradecido también al resto de compañeros del IEO que, de una u otra manera, han mostrado su interés por este trabajo, especialmente a los vigilantes.

Gracias a la Dr.^a Susana Magadán (INRA) por su implicación en el estudio del sistema inmune de los rodaballos triploides y al Prof. Dr. Manuel Vera (UDG) por su colaboración en los trabajos realizados con marcadores genéticos. También quiero dar las gracias al Dr. Josep Rotllant (CSIC) por su ayuda en el estudio de las malformaciones corporales de los rodaballos y por procurarme los medios necesarios para desarrollar las técnicas radiográficas en rodaballo.

Quiero dar las gracias también a todos los miembros del Grupo Acuigen de la Facultad de Veterinaria de la USC (Campus de Lugo) por darme la posibilidad de aprender las técnicas genéticas utilizadas en esta tesis y por aclararme todas las dudas que me surgieron durante mis estancias en Lugo. Gracias a Ania, Sonia, Mónica, María (Peque), Susana, Lucía, María (Porte) y Vanesa por resolver mis dudas de novato y, sobre todo, por el excepcional ambiente de trabajo. Un agradecimiento muy especial para Manel y Adri, gracias a ellos pude comprobar los efectos provocados por el “cambio de luz” en esta preciosa ciudad amurallada. Gracias también a Diego y Xoana, ha sido un placer compartir congresos de acuicultura con vosotros, sobre todo en lugares tan horribles como Creta...

Mi más sincero agradecimiento a la Prof.^a Dr.^a María Dolores Ayala y al Prof. Dr. Octavio López-Albors por haberme recibido en el Departamento de Anatomía y Anatomía Comparadas de la Facultad de Veterinaria de la Universidad de Murcia, y por haberme introducido en el campo de la fisiología muscular de peces. Gracias por su generosidad y dedicación durante la estancia realizada para la caracterización muscular de los rodaballos. Gracias también a Vicente (hoy escritor de éxito), que me acogió en las pachangas de fútbol de su grupo de amigos y que hizo que mis días en Murcia fuesen mucho más agradables.

I would like to express my sincere gratitude to Prof. Ian Johnston from the Scottish Oceans Institute (SOI) for giving me the opportunity to carry out a research stage at Fish Muscle Research Group. I am also in debt with the people from his team for their help during my stage. Dani and Clara thank you very much for your teaching in the laboratory and for your hospitality. I remember fondly the day we saw the Queen of England in the Highlands Games of Braemar. Thanks also to Tom Ashton who has shown me the fantastic seabed of Scotland. I had never seen so many lobsters together in my life. Thank you very much to other SOI members who have made my time at St Andrews was more comfortable; especially Olivia, Wim and Mónica (*the seabass team*).

Gracias al Prof. Dr. Carlos Pereira (USC) por haberme brindado la oportunidad de formar parte del equipo docente del Máster Interuniversitario en Acuicultura, y así intentar transmitir la experiencia adquirida durante estos años. Ha sido, y está siendo, una experiencia muy enriquecedora.

Gracias a todos los compañeros de mi etapa laboral en el Departamento de Ecología y Biología Animal de la Universidad de Vigo, especialmente a Esther, Cris, Julia y Paloma, con quienes he pasado muy buenos momentos, tanto en el laboratorio como en los largos días de muestreo. Un agradecimiento muy especial a la Prof.^a Dr.^a Elsa Vázquez por animarme a iniciar esta tesis doctoral y, sobre todo, por haberme dado la posibilidad de hacer un parón en la tesis para ir a investigar un mes a la Antártida, haciendo así posible uno de mis grandes sueños.

Gracias también a todos mis colegas de mi etapa laboral en el Grupo Ecobiomar del Instituto de Investigaciones Marinas de Vigo por el apoyo recibido durante la fase de redacción de esta tesis, especialmente a Garcí, Álvaro y Miguel Bao quienes siempre me han animado a conseguir mi objetivo y tanto me han enseñado sobre biología marina. Gracias por esas conversaciones sobre ciencia y no ciencia. Muchas gracias al Prof. Dr. Angel Guerra por haber compartido conmigo su conocimiento y por haber confiado en mí para formar parte de su equipo.

A mis amigos de la etapa universitaria: a Jesús (Tiko) que no ha parado de animarme con la tesis y quien me ha mostrado su amistad incondicional desde que nos conocimos allá por 1997. Gracias también por ejercer de perfecto anfitrión durante mis estancias en Lugo. A Celso y Serra, compañeros de viaje en los memorables *Tikotours* y siempre dispuestos a sacarme una sonrisa en los momentos difíciles. A Javi, compañero de carrera, de trabajo, de piso y de algún otro viaje a islas de piratas, que tanto me ha ayudado en la recta final de la tesis. Nos vemos en Canadá...

A los amigos de Vigo, tanto *Los niños de la piña* como *Los Caribeños*, por el interés que siempre han mostrado por mi trabajo. A los *IGaFa's*, Alex, Rubén, Nacho, Bruno y Graci con quienes compartí y comparto tan buenos momentos y a los que tanto les sorprendió que me embarcara en esta aventura doctoral. A Fernando Alonso (el no famoso) por contagiarme su optimismo y su buen humor desde que lo conocí en *Melrose Place*, gracias por aconsejarme siempre en cada etapa de la tesis. A Miguel Gil, por sus ánimos y por haber sido durante dos años un paciente *underwater model*.

Quiero dar las gracias a mi familia, muy especial a Marta quien, a pesar de que esta tesis le ha supuesto sacrificios personales, siempre ha confiado en mí y me ha animado para conseguir mis metas. A mi pequeña Alba, que nació durante esta etapa doctoral y a la que intentaré devolverle todo el tiempo que esta tesis le ha robado. A mis padres, quienes me han dado la posibilidad de estudiar y formarme como científico y como persona. A mis hermanos, que aunque no entienden muy bien en qué trabaja el pequeño de la familia, siempre preguntaron ¿cómo va esa tesis?

Por último, no quiero terminar esta parte de agradecimientos sin hacer especial mención a mi amigo y compañero del IGaFA Fernando que tan inesperablemente nos dejó y que me habría gustado que hubiera estado presente en la lectura de este trabajo. En su memoria va también esta tesis.

Gracias a todos



Jorge Hernández Urcera ha sido beneficiario de una beca de formación predoctoral como personal investigador, financiada por el Instituto Español de Oceanografía (IEO) bajo el plan de formación *Aplicación de técnicas genéticas en el estudio de especies marinas* entre 2008 y 2012 que se desarrolló en la Planta Experimental de Cultivos Marinos del Centro Oceanográfico de Vigo. Además de una ayuda del IEO para la realización de una estancia de investigación en el *Scottish Oceans Institute* de la Universidad de Saint Andrews (Escocia) entre el 20 de julio y el 15 de diciembre de 2011.

Así mismo, ha participado en el proyecto de investigación RODAGEN (*Determinación del efecto de la temperatura de cultivo sobre la proporción de sexos en las progenies del rodaballo*) en el Centro Oceanográfico de Vigo entre los años 2011 y 2014.



Resumen. La morfología externa e interna, la estructura esquelética, la susceptibilidad a la apoptosis de leucocitos, la celularidad muscular y la calidad de la carne de rodaballos diploides y triploides fueron analizadas a partir de seis familias de rodaballos, cultivadas en la Planta Experimental de Cultivos Marinos del Centro Oceanográfico de Vigo (IEO), a las que se les indujo la triploidía mediante choque térmico frío. Aunque se encontraron algunas diferencias entre diploides y triploides, los resultados indican que, en comparación con otras especies triploides cultivadas, el nivel de ploidía en el rodaballo tiene un menor efecto sobre la biología de la especie y la calidad del producto final. Asimismo, se presenta una nueva herramienta para la detección sencilla, rentable y eficaz de rodaballos triploides basada en la utilización de marcadores moleculares microsatélite. Este estudio rellena un importante vacío sobre el conocimiento de los efectos biológicos de la inducción a la triploidía en rodaballo. Los resultados presentados podrán ser considerados por el sector acuícola para la producción de ejemplares estériles a escala comercial de esta especie, de la que Galicia es el principal productor de Europa.

Palabras clave: triploidía, *Scophthalmus maximus*, verificación de la ploidía, efectos biológicos, calidad de la carne.

Resumo. A morfoloxía externa e interna, a estrutura esquelética, a susceptibilidade á apoptose de leucocitos, a celularidade muscular e a calidade da carne de rodaballos diploides e triploides foron analizadas a partir de seis familias de rodaballos, cultivadas na Planta Experimental de Cultivos Mariños do Centro Oceanográfico de Vigo (IEO), ás que se lles induciu a triploidía mediante choque térmico frío. Aínda que se encontraron algunhas diferenzas entre diploides e triploides, os resultados indican que, en comparación con outras especies triploides cultivadas, o nivel de ploidía no rodaballo ten un menor efecto sobre a bioloxía da especie e a calidade do produto final. Así mesmo, preséntase unha nova ferramenta para a detección sinxela, rendible e eficaz de rodaballos triploides baseada na utilización de marcadores moleculares microsatélite. Este estudo enche un importante baleiro sobre o coñecemento dos efectos biolóxicos da indución á triploidía en rodaballo. Os resultados presentados poderán ser considerados polo sector acuícola para a produción de exemplares estériles a escala comercial desta especie, da que Galicia é o principal produtor de Europa.

Palabras chave: triploidía, *Scophthalmus maximus*, verificación da ploidía, efectos biolóxicos, calidade da carne.

Abstract. The external morphology, skeletal structure, the dimensions of the internal organs, susceptibility to apoptosis of leucocytes, muscle cellularity and flesh quality of diploid and triploid turbot have been analyzed from six families of turbot, reared in the Experimental Marine Aquaculture Facilities of the Oceanographic Center of Vigo (IEO), whose triploidy was induced by cold-shock. Although some differences were found between diploid and triploid, results indicate that ploidy level in turbot has lesser effects on the biology of the species and the quality of the final product as compared with other cultivated triploid species. In addition, in this study is presented a new tool for simple, cost-effective and efficient detection of triploid turbot based on the use of microsatellite molecular markers. This study fills an important gap for understanding the biological consequences of inducing triploidy in turbot. The results reported can be considered by the aquaculture industry in order to produce sterile fish on a commercial scale in this species, of which Galicia is the leading European producer.

Keywords: triploidy, *Scophthalmus maximus*, ploidy assessing, biological effects, flesh quality.



RELACIÓN DE PUBLICACIONES QUE SE INCLUYEN EN LA TESIS DOCTORAL

A partir de las investigaciones realizadas en esta tesis doctoral se han generado los artículos científicos que se detallan a continuación y que se incluyen en la presente memoria:

Hernández-Urcera, J., Vera, M., Magadán, S., Pino-Querido, A., Cal, R. & Martínez, P. (2012). Development and validation of a molecular tool for assessing triploidy in turbot (*Scophthalmus maximus*). *Aquaculture*, 330: 179-184. Factor de Impacto: 2,009.

Hernández-Urcera, J., Lluch, N., Cal, R. & Magadán, S. (En revisión). Effect of triploidy on susceptibility to apoptosis in turbot (*Scophthalmus maximus*) leucocytes. *Aquaculture Research*, ARE-OA-15-Jul-490. Factor de Impacto: 1,328.

Hernández-Urcera, J., Torres, E., Barreiro, D., Ríos, P., Barreiro-Lois, A., Alonso, J., Cal, R. & Rotllant, J. (2012). Induction of triploidy in turbot (*Scophthalmus maximus*) does not affect gross body morphology and skeleton characteristics. *Aquaculture*, 338: 309-312. Factor de Impacto: 2,009.

Hernández-Urcera, J., Ayala, M.D., C., Periago, M.J., Santaella, M., López-Albors, O. & Cal, R. (En revisión). Effect of triploidy on muscle cellularity and flesh quality of turbot (*Scophthalmus maximus*). *Aquaculture*, AQUA-D-15-00748. Factor de Impacto: 1,828.

Ayala, M.D, Cal, R., **Hernández-Urcera, J.**, Blanco, A. & López-Albors, O. (2013). Post-mortem degradation of the muscle tissue in diploid and triploid turbot (*Scophthalmus maximus*). *Aquaculture International*, 21: 1077-1090. Factor de Impacto: 0,960.





ÍNDICE



ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN GENERAL	1
1.1. LA TRIPLOIDÍA EN PECES	3
1.1.1. Inducción a la triploidía en peces	5
1.1.2. Verificación de la triploidía en peces	8
1.1.3. Efectos biológicos de la inducción a la triploidía en peces	10
1.2. LA TRIPLOIDÍA EN EL RODABALLO	16
1.2.1. Inducción a la triploidía en el rodaballo	17
1.2.2. Verificación del nivel de ploidía en el rodaballo	18
1.2.3. Efectos biológicos de la inducción a la triploidía en rodaballo	19
1.3. JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO	21
2. OBJETIVOS	25
3. METODOLOGÍA	29
3.1. CONSTITUCIÓN DEL STOCK DE REPRODUCTORES	31
3.2. INDUCCIÓN A LA TRIPLOIDÍA	36
3.3. CONFIRMACIÓN DE LA TRIPLOIDÍA	38
3.4. CONDICIONES DE CULTIVO	41
4. PUBLICACIONES	45
4.1. VERIFICACIÓN DE LA TRIPLOIDÍA	47
4.1.1. Desarrollo y validación de una herramienta molecular para la evaluación de la triploidía en rodaballo (<i>Scophthalmus maximus</i>)	47
4.2. APOPTOSIS EN LEUCOCITOS	65
4.2.1. Efecto de la triploidía en la susceptibilidad a la apoptosis en leucocitos de rodaballo (<i>Scophthalmus maximus</i>)	65
4.3. MALFORMACIONES CORPORALES	81
4.3.1. La inducción a la triploidía en rodaballo (<i>Scophthalmus maximus</i>) no afecta a la morfología general del cuerpo ni las características esqueléticas	81
4.4. TEJIDO MUSCULAR	87
4.4.1. Efecto de la triploidía en la celularidad muscular y en la calidad de la carne de rodaballo (<i>Scophthalmus maximus</i>)	87
4.4.2. Degradación post-mortem del tejido muscular en diploides y triploides de rodaballo (<i>Scophthalmus maximus</i>)	111
5. DISCUSIÓN GENERAL	127
5.1. VERIFICACIÓN DE LA TRIPLOIDÍA POR EL EFECTO SOBRE LA DOSIS CROMOSÓMICA	129
5.2. EFECTO SOBRE LA APOPTOSIS DE LEUCOCITOS	130
5.3. EFECTO SOBRE EL CRECIMIENTO SOMÁTICO Y LA CALIDAD DE LA CARNE	131
6. CONCLUSIONES GENERALES	137
7. BIBLIOGRAFÍA	141
8. ANEXO	157





1. INTRODUCCIÓN GENERAL



1. INTRODUCCIÓN GENERAL

1.1. LA TRIPLOIDÍA EN PECES

La acuicultura es el sector de producción animal que más rápidamente está creciendo en el mundo. La producción global de peces se ha incrementado con una tasa anual del 8.7% desde 1970 y actualmente representa más del 45% del suministro mundial total de pescado, mostrándose como única alternativa frente al futuro déficit de este recurso (FAO, 2014).

Actualmente, la maduración sexual precoz de los peces cultivados es uno de los mayores problemas para la acuicultura intensiva de muchas especies de salmónidos, lubinas, peces planos, bacalaos, tilapias, besugos y percas (Taranger *et al.*, 2010). El aporte de alimento de alta calidad y la optimización de las condiciones de cultivo producen altas tasas de crecimiento, acortando la edad del inicio de la maduración sexual en peces cultivados en comparación con peces salvajes de la misma especie (Thorpe, 2004). La maduración precoz representa un problema potencial para el cultivo de una especie, ya que los animales destinan una gran parte de la energía que obtienen con el alimento a la maduración de las gónadas y a la formación de los gametos (Thorpe, 2004), por lo que se produce una gran proporción de individuos maduros pero de menor tamaño y, además, con un pobre potencial de crecimiento (Basavaraju *et al.*, 2002; Manning *et al.*, 2004; Piferrer *et al.*, 2009). Por otro lado, durante la maduración sexual muchas especies de peces son más susceptibles a padecer enfermedades, aumentando la tasa de mortalidad (Schreck *et al.*, 2001), y se ven afectadas las propiedades organolépticas de la carne, provocando alteración de las reservas de grasa y cambios en los perfiles lipídicos (Johnston *et al.*, 2000). Todos estos problemas relacionados con la maduración sexual tienen unas consecuencias muy negativas desde el punto de vista de la producción (Felip *et al.*, 2006), llevando asociadas pérdidas económicas importantes (Zanuy *et al.*, 2001).

El control de la maduración sexual puede ejercerse mediante la manipulación de las condiciones ambientales (Carrillo *et al.*, 2007), o bien recurriendo a las técnicas de manipulación cromosómica por inducción de la triploidía.

La poliploidía consiste en el incremento del número de genomas en un individuo o especie incluyendo tres o más conjuntos de cromosomas dentro de un organismo. Así los triploides son individuos poliploides con tres conjuntos de cromosomas ($3n$), los tetraploides con cuatro ($4n$) y los hexaploides con seis ($6n$) (Dunham, 2004). La poliploidía más utilizada en acuicultura es la triploidía, que es inviable en mamíferos y aves pero es viable en peces (Chourrout *et al.*, 1986). En el medio natural la mayoría de las especies de peces teleósteos tienen un número diploide de cromosomas, pero la triploidía puede aparecer de forma natural en individuos no inducidos (Dunham *et al.*, 2004; Le Comber & Smith., 2004), y ya ha sido documentada en especies de las familias Poeciliidae (Cimino, 1972), Cyprinidae (Gold & Avise, 1976) y Salmonidae (Thorgaard & Gall, 1979; Utter *et al.*, 1983), entre otras. De hecho, el 63% de las especies de peces pertenecen a nueve órdenes en los cuales se incluyen poliploides.

El avance en el desarrollo de las técnicas de manipulación cromosómica ha permitido inducir a la triploidía a un gran número de especies de cultivo. En los últimos años, la inducción a la triploidía se ha convertido en una herramienta prometedora para la acuicultura, debido a que en muchas de las especies en las que ha sido inducida los triploides son funcionalmente estériles. Debido a esta característica, la triploidía en peces está siendo útil para evitar la ralentización del crecimiento, el deterioro de la carne y la mayor mortalidad de los diploides, inconvenientes asociados con la maduración sexual (Tiwarly *et al.*, 2004). Los triploides también han sido utilizados para prevenir el impacto genético de los escapes de jaulas de cultivo, impidiendo su cruzamiento con individuos salvajes (Donaldson *et al.*, 1993). Además los peces triploides representan modelos útiles para la investigación básica sobre procesos genéticos, fisiológicos y evolutivos (Tiwarly *et al.*, 2004).

El interés inicial de los triploides para su uso en acuicultura comienza en los años 70, sin embargo, los inconvenientes de su producción no compensaban las ventajas obtenidas por su esterilidad. Los mayores problemas residían por un lado, en la eficiencia de la producción debido a la menor viabilidad de los huevos triploides, y por otro, en que los peces triploides eran más sensibles al estrés de la producción en comparación con los diploides (Jungalwalla, 1991; Ojolic *et al.*, 1995). Esto llevó al abandono durante un tiempo de las técnicas de inducción a la triploidía a favor de métodos de control de la maduración sexual más caros y menos efectivos como, por ejemplo, la manipulación del fotoperíodo. Sin embargo, la actual problemática sobre la sostenibilidad de la industria de la acuicultura, junto con un incremento

en el conocimiento de la fisiología y requerimientos de cultivo de los triploides, han llevado a reanudar el interés en la idea de la triploidía (Fraser *et al.*, 2012a). Actualmente, las especies en las que la triploidía es utilizada para su uso en acuicultura incluyen salmónidos, principalmente trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*), trucha común (*Salmo trutta*) y salmón atlántico (*Salmo salar*), ayu (*Plecoglossus altivelis*), dojo (*Misgurnus anguillicaudatus*), y la carpa herbívora (*Ctenopharyngodon idella*) (Powell *et al.*, 2009; Beaumont *et al.*, 2010).

1.1.1. Inducción a la triploidía en peces

La inducción artificial a la triploidía es una de las técnicas de manipulación cromosómica más utilizadas en acuicultura. La base de la manipulación cromosómica radica en la posibilidad de manipular el conjunto cromosomas heredado de los padres, decidiendo cuáles y cuántos conjuntos formarán parte del cigoto (Thorgaard, 1983). Las técnicas de manipulación cromosómica consisten en la manipulación de juegos enteros de cromosomas alterando la separación de los cromosomas durante las divisiones celulares o inactivando el DNA de los gametos. La inducción artificial de la triploidía tiene como objeto la producción de individuos con un conjunto extra de cromosomas. Se empezó a desarrollar para especies de agua dulce (Swarup, 1959), pero en los últimos treinta años ha habido un gran desarrollo en la investigación y aplicación de esta técnica en especies marinas de las familias Pleuronectidae, Sparidae, Paralichthyidae, Moronidae, Soleidae y Scophthalmidae (Felip *et al.*, 2001a; Piferrer *et al.*, 2009).

Los métodos de inducción a la triploidía se basan en la alteración de las divisiones celulares; de la segunda meiosis (métodos directos), o de la primera mitosis (métodos indirectos). La meiosis es el fenómeno biológico de mayor importancia en los organismos de reproducción sexual, y es la base para la aplicación de las técnicas de manipulación del genoma en especies acuáticas (Cal, 2005). Este proceso determina la diferencia del número de cromosomas presentes en las células somáticas, y además genera nuevas combinaciones cromosómicas no presentes en los progenitores mediante el entrecruzamiento meiótico. Implica una única duplicación del ADN y dos divisiones celulares sucesivas tras las cuales las células germinales diploides con $2n$ cromosomas, pasan a cuatro células haploides con n cromosomas (Tave, 1993b; Alberts *et al.*, 1994). En peces teleósteos, la primera división meiótica de los oocitos de primer orden se inicia después de la eclosión. Estos oocitos completan la división meiótica I, formando un pequeño corpúsculo y un oocito de segundo

orden, que entra en la división meiótica II. Aquí se detiene, y finaliza meses más tarde con la ovulación de oocitos secundarios, cuando es estimulado por la fecundación y empieza el desarrollo embrionario. Así, la segunda división meiótica se completa solamente después de la fertilización (Carrasco, 1998). La mitosis, a diferencia de la meiosis, produce células hijas con idéntica información genética que la célula de la que se originan y cada cromosoma, independientemente de su procedencia (materna o paterna), se comporta de manera autónoma.

Los métodos de inducción a la triploidía son directos cuando los tratamientos se aplican a las células que se convertirán en individuos triploides. Se realizan normalmente minutos después de la fertilización y provocan la interrupción de la segunda división meiótica, impidiendo la extrusión del segundo corpúsculo polar (Tiwary *et al.*, 2004). El resultado es un cigoto triploide que contiene el genoma presente en el óvulo, el genoma presente en el espermatozoide y el genoma presente en el segundo corpúsculo polar (Carrasco, 1998) (Fig. 1.1).

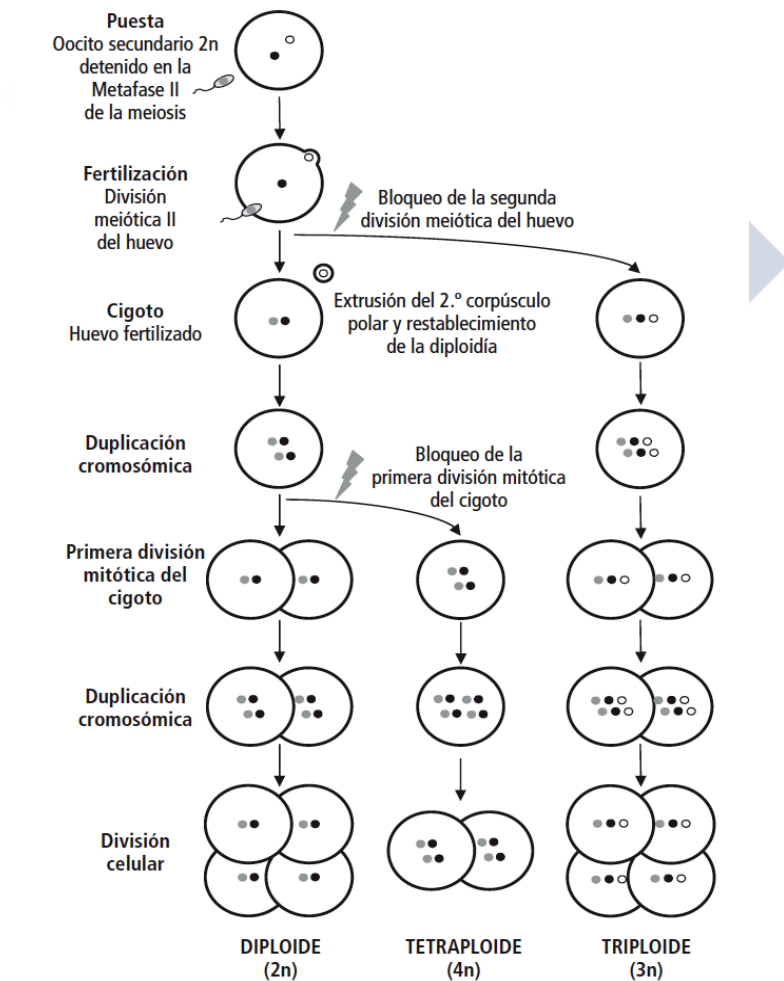


Fig. 1.1. Esquema de la obtención de peces triploides y tetraploides mediante un choque físico. Los puntos de distinto color representan cada uno un juego entero de cromosomas de origen materno (blanco y negro) y paterno (gris). Piferrer *et al.* (2007)

En los métodos de inducción indirectos, la triploidía puede obtenerse mediante la fertilización de un huevo normal con el esperma de un tetraploide, que es $2n$. A su vez, los tetraploides pueden conseguirse mediante la inhibición de la primera división mitótica una vez que se ha duplicado el número de cromosomas del cigoto (Fig. 1.1). La viabilidad de las progenies es limitada en peces, lo que hace que esta alternativa no tenga mucho futuro (Carrasco 1998; Arai, 2000).

Los tratamientos de inducción a la triploidía pueden ser físicos (choque térmico o hidrostático) o químicos (sustancias que impiden la división celular, usualmente despolimerizantes de microtúbulos). Los choques térmicos, de calor o de frío, han sido utilizados con éxito en la producción de individuos triploides en muchas especies acuáticas. Se trata de aplicar cambios bruscos de la temperatura a huevos poco tiempo después de la fertilización. Estos choques son los más utilizados por la industria debido a su simplicidad, su bajo coste y su eficiencia. En los choques térmicos, no sólo hay que considerar la temperatura del choque en sí, sino la diferencia de temperatura antes y durante el choque (Ihsen *et al.*, 1990). Los choques hidrostáticos presentan la ventaja de aplicar un tratamiento más uniforme a los huevos, solucionando las dificultades de la transferencia uniforme de temperatura en los choques térmicos cuando se utilizan grandes volúmenes de huevos. La duración de los choques de presión es más corta que la de los choques térmicos, lo que puede presuponer una reducción de la mortalidad (que no siempre ocurre), aunque también han sido descritas anomalías en el desarrollo embrionario y aberraciones cromosómicas tras su aplicación (Carrasco, 1998). Las sustancias químicas más utilizadas han sido los alcaloides como la colchicina, la citocalasina B, y sustancias con acción anestésica como el óxido nítrico, pero son altamente inductores de formación de tumores y muy citotóxicos, por lo que su uso se limita a la investigación (Johnstone, 1995; Felip, 2000a).

En los choques térmicos e hidrostáticos existen tres variables fundamentales que condicionan su eficiencia y que son, de mayor a menor importancia: el momento de la aplicación del choque, su intensidad y su duración (Felip *et al.*, 1997). Los valores óptimos de cada una de estas variables dependen de la especie y es fundamental conocerlos para conseguir la mayor proporción de triploides posible junto con altas tasas de supervivencia (Piferrer *et al.*, 2007). La aplicación de estas técnicas en cualquier especie requiere experiencia previa en el manejo de los reproductores, la obtención de los gametos y la fertilización artificial. Además, para la práctica con éxito de estas metodologías es necesario

conocer el tiempo después de la fertilización de los huevos en el que aplicar el tratamiento con el fin de manipular los juegos enteros de cromosomas. Idealmente, el uso de estas técnicas exige la disponibilidad de lotes de reproductores que respondan a los tratamientos de inducción ambiental y/u hormonal de la puesta y produzcan gametos de buena calidad de forma predecible (Piferrer et al., 2007). En general, los choques térmicos (fríos o calientes) son adecuados para especies con huevos pequeños, mientras que para especies con huevos grandes, como los salmónidos, son preferibles los choques hidrostáticos (Benfey *et al.*, 1988), por su mayor eficiencia (Johnson *et al.*, 2004).

1.1.2. Verificación de la triploidía en peces

Las técnicas para la producción de individuos triploides no siempre son totalmente efectivas y por eso la triploidía debe ser confirmada en una muestra significativa o en todos los individuos nacidos de huevos tratados, dependiendo del objetivo de estudio. Para que resulten rentables en instalaciones comerciales, los métodos utilizados deben poder analizar un gran número de individuos y, además, ser lo más rápidos y baratos posibles. Los métodos de verificación de la triploidía se clasifican en tres tipos, citogenéticos, citológicos y de cuantificación de ADN nuclear (Carrasco, 1998).

Los métodos citogenéticos se basan en la determinación del número de los cromosomas o de las regiones organizadoras del nucleolo. La producción del cariotipo es un método barato y no requiere grandes equipos, y sigue siendo el único método para determinar con precisión el número y morfología de los cromosomas, pero es laborioso y no es práctico cuando se trata de identificar un gran número de individuos. Para contar los cromosomas se hace sobre placas metafásicas tomando como referencia el cariotipo de la especie, que es la presentación de los cromosomas de un individuo en longitud decreciente y agrupando cromosomas homólogos en base a su morfología y posición del centrómero (Fig. 1.2). Los mejores cariotipos se obtienen de preparaciones de embriones o peces muy jóvenes (Carrasco, 1998). El número de regiones organizadoras del nucleolo (NOR, *nucleolar organizer regions*) teñidas con nitrato de plata es también un método fiable y sencillo (Fig. 1.2), pero se necesita conocer las características citogenéticas de la especie a analizar para poder deducir el nivel de ploidía a partir del número de NOR presentes en el cariotipo (Carrasco 1998).

Los métodos citológicos se basan en la determinación del tamaño celular o nuclear, normalmente en eritrocitos (Fig. 1.2). El aumento en la cantidad de ADN y cromosomas,

consecuencia de la poliploidización, se traduce en un aumento en el tamaño nuclear y celular (Carrasco, 1988). La medición microscópica de las dimensiones nucleares o celulares es una técnica relativamente barata que requiere únicamente de un microscopio óptico, y es la más sencilla cuando el tamaño de los peces es suficiente para poder extraerles sangre sin recurrir al sacrificio. Esta técnica ha sido descrita habitualmente en las especies en las que se ha inducido la triploidía (Benfey, 1999; Piferrer *et al.*; 2003; Luckenbach *et al.*, 2004). Sin embargo, presenta el inconveniente del consumo de tiempo en la extracción de sangre, elaboración y tinción del frotis, y el análisis cuando se trata de gran número de peces (Carrasco, 1998). La posibilidad de automatizar el proceso de medición electrónica del volumen nuclear o celular de los eritrocitos con un contador de partículas facilitaría su aplicación (Tiwary *et al.*, 2004). El contador detecta la diferencia de tamaño de la partícula y así provee de un método rápido y eficiente para la estimación de la ploidía. Pero los costes de su utilización son altos, lo que hace que esta técnica solo sea rentable en explotaciones de gran tamaño.

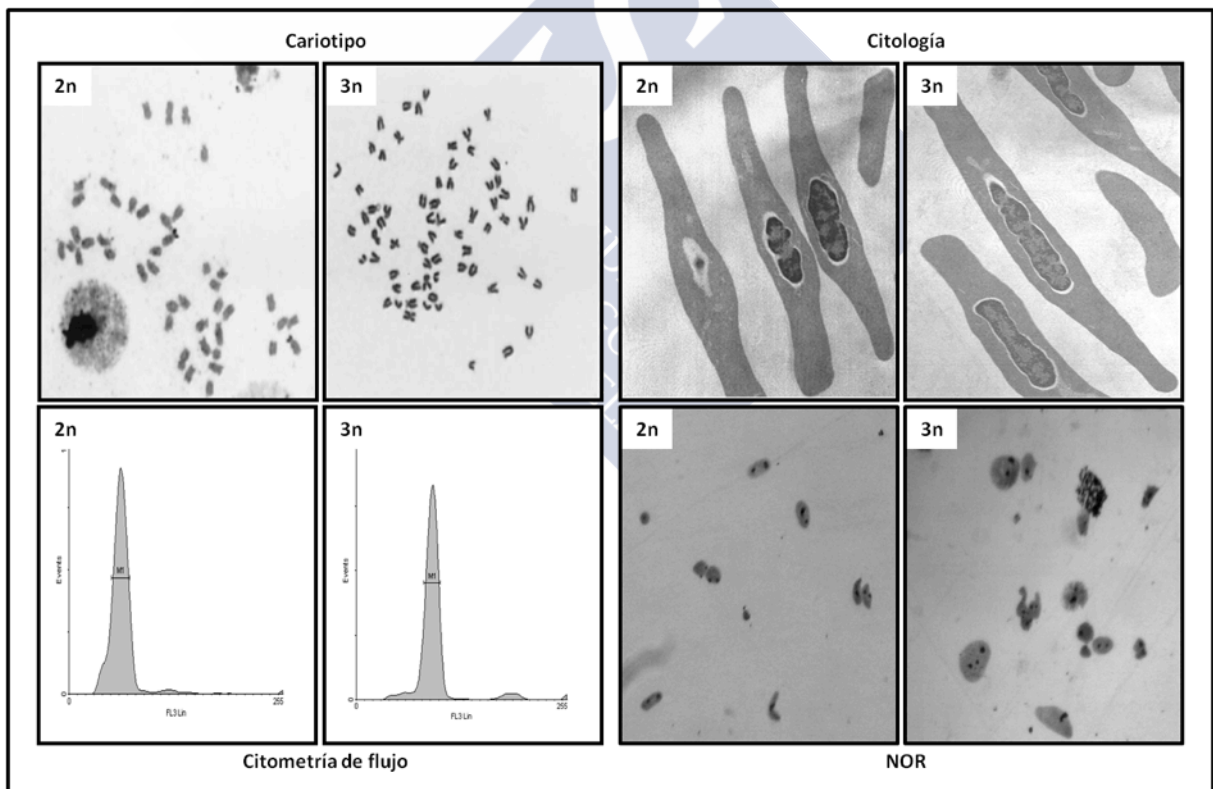


Fig. 1.2. Métodos más comunes para la verificación de la ploidía. 2n: diploides; 3n: triploides.

Los métodos de cuantificación del ADN se basan en la cuantificación fluorimétrica o colorimétrica del ADN nuclear mediante tinciones o pigmentos con afinidad específica por el

ADN. La citometría de flujo (Fig. 1.2.1) puede ser utilizada para analizar con gran rapidez el contenido de ADN de un alto número de células, con una precisión mayor que la alcanzada por cualquier otra técnica cuantitativa. Sin embargo, su uso se ve limitado en función del tamaño de los peces. Además, el elevado coste del instrumento, así como la formación especializada que se requiere, hace que este método de determinación sea probablemente de difícil aplicación en explotaciones acuícolas

1.1.3. Efectos biológicos de la inducción a la triploidía en peces

Para acomodar el conjunto extra de cromosomas, los volúmenes nuclear y celular son mayores en los triploides que en los diploides, aunque se mantiene la misma *ratio* entre el tamaño del núcleo y del citoplasma (Small & Benfey, 1987; Flajšhans *et al.*, 2011). Además, como los órganos de los triploides son, por lo general, del mismo tamaño que los diploides, están compuestos por menos células (Swarup, 1959; Aliah *et al.*, 1990). Sin embargo, este patrón no es constante para todos los tipos de células y es probable que no sea aplicable a células en las que el núcleo ocupe solamente una pequeña parte del volumen total de la célula. Todavía se desconoce si el incremento de tamaño celular puede alargar las vías de señalización o deteriorar los procesos de transporte a través de la membrana (Maxime, 2008). Además, tampoco existe información sobre el mecanismo preciso de homeostasis responsable de la reducción del número de células en triploides.

La inducción a la triploidía produce efectos diferentes en el desarrollo gonadal de machos y hembras, sin embargo, en la mayoría de las especies inducidas ambos sexos son estériles, ya que son incapaces de producir gametos viables (Peruzzi *et al.*, 2009). Las hembras presentan ovarios subdesarrollados y no muestran señales de maduración fisiológica o morfológica (Benfey *et al.*, 1989); en ellas, la triploidía interfiere con el emparejamiento normal de los cromosomas homólogos durante la fase inicial de la meiosis (Krisfalusi & Cloud, 1999; Cuñado *et al.*, 2002), inhibiendo el futuro desarrollo de gametos debido a la falta de producción de hormonas en las capas teca y granulosa del folículo (Schafhauser-Smith & Benfey, 2003). Por el contrario, en los machos la triploidía bloquea las fases tardías de la meiosis (Krisfalusi & Cloud, 1999), permitiendo el desarrollo gonadal completo debido a la producción de células esteroideogénicas (Benfey *et al.*, 1989). Sin embargo, la progenie de los machos triploides es normalmente aneuploide y no sobrevive más allá de los estadios embrionario o larvario (Peruzzi *et al.*, 2009; Feindel *et al.*, 2010).

Los peces triploides tienen generalmente una heterozigosis más alta que los diploides (Allendorf & Leary, 1984; Leary *et al.*, 1985). Bajo condiciones óptimas de cultivo para los diploides, los tejidos de los triploides muestran patrones de expresión génica similares a los diploides, debido a una expresión modulada (Johnson *et al.*, 2007, Shrimpton *et al.*, 2007, Garner *et al.*, 2008, Ching *et al.*, 2010). Sin embargo, todavía no ha sido determinado el mecanismo por el cual es regulada la contribución específica de cada genoma en los triploides (Pala *et al.*, 2008).

Los estudios realizados hasta la fecha sugieren que la supervivencia de los peces triploides es comparable a la de los diploides a partir de la etapa postlarvaria (Fraser *et al.*, 2012a). Aunque en varios periodos de desarrollo hasta llegar a la etapa larvaria los triploides suelen sufrir mayores mortalidades que los diploides, estos niveles están dentro de los límites industriales aceptables si el procedimiento de la inducción se encuentra optimizado (Piferrer *et al.*, 2009). Existen ejemplos de tasas similares de supervivencia postlarvaria entre diploides y triploides de varias especies, incluyendo Salmón Atlántico (Oppedal *et al.*, 2003), trucha arcoíris (Bonnet *et al.*, 1999) y lubina (Felip *et al.*, 2001). Igual que en los diploides, en los triploides existe variabilidad en la supervivencia entre distintas familias (Johnson *et al.*, 2004), sin embargo, las familias que funcionan bien como diploides no necesariamente tienen que hacerlo igualmente como triploides (Taylor *et al.*, 2011). Se conoce que la calidad de huevos tiene un mayor efecto en la supervivencia que el nivel de ploidía en salmón Atlántico, con mortalidades en triploides muy superiores a las de los diploides cuando ambos son cultivados a partir de huevos de baja calidad (Taylor *et al.*, 2011), por lo que resulta esencial utilizar huevos de alta calidad para la producción de triploides. En los casos en los que la mortalidad fue mayor en triploides juveniles y adultos comparada con los diploides, la causa de la muerte estuvo casi siempre relacionada con periodos de altas temperaturas del agua y niveles de hipoxia agudos (Myers & Hershberger, 1991; Blanc *et al.*, 1992; Ojolick *et al.*, 1995). Por otro lado, los triploides presentan una menor mortalidad que los diploides durante el periodo de maduración sexual (Inada & Taniguchi, 1991; Yamamoto & Iida, 1995a; Gillet *et al.*, 2001; Cal *et al.*, 2006). El consenso general es que el incremento de los niveles de esteroides en el plasma, que ocurre como consecuencia de la maduración sexual, conlleva una inmunosupresión progresiva y aumenta la sensibilidad de los peces a las patologías (Slater & Schreck, 1997; Harris & Bird, 2000). Por lo tanto, como las hembras triploides no maduran

(Benfey *et al.*, 1989), su sistema inmune no se ve afectado por el aumento de los esteroides sexuales en el plasma (Yamamoto & Iida, 1995b).

A pesar de que en muchos estudios se ha comparado el crecimiento entre diploides y triploides de la misma especie, los resultados han sido diversos, obteniendo tasas de crecimiento mejores, iguales o peores entre ambos grupos de ploidía dependiendo de la especie y el estudio (Piferrer *et al.*, 2009). Los motivos de esta heterogeneidad tienen que ver con el estado de desarrollo, el impacto del cultivo conjunto con diploides, la proporción de sexos, la variación genética y asumir, sin haber hecho estudios previos, que las condiciones óptimas de crecimiento son las mismas para diploides y triploides. Sin embargo, existe una tendencia general en triploides a mostrar un menor crecimiento en las etapas tempranas de vida en comparación con los diploides, pero un crecimiento similar en las etapas posteriores a la primera alimentación (Fraser *et al.*, 2012a). Hasta la fecha, los triploides están siendo alimentados con dietas formuladas para peces diploides, presuponiendo que los triploides tienen los mismos requerimientos nutricionales. Sin embargo, en base a los estudios desarrollados en salmones triploides, se conoce que para disminuir la incidencia de deformidades esqueléticas, los triploides requieren una dieta con mayor contenido en fósforo en comparación con los diploides (Fjelldal *et al.*, 2015).

Hasta la fecha, los estudios realizados sobre el sistema inmune de los triploides son contradictorios. Se ha observado una mayor susceptibilidad a enfermedades en truchas arcoíris triploides comparándolas con las diploides (Ojolick *et al.*, 1995). En salmones triploides se encontró una mayor infección por parte de parásitos del género *Gyrodactylus* (Ozerov *et al.*, 2010). Estudios realizados *in vitro* muestran evidencias de una misma actividad respiratoria y fagocitosis por microlitro de sangre en neutrófilos triploides y diploides (Budiño *et al.*, 2006). La actividad del complemento y de los neutrófilos también resultaron similares en trucha arcoíris de ambas ploidías (Yamamoto & Iida, 1995b). Además, los diploides y triploides suelen tener recuentos celulares similares en salmónidos (Benfey & Biron, 2000; Dorafshan *et al.*, 2008), rodaballo (Budiño *et al.*, 2006) y tenca (Svobodová *et al.*, 2001). Por el contrario, se encontraron diferencias relacionadas con la ploidía en la proporción de neutrófilos y linfocitos B en la sangre periférica y el riñón anterior de salmón Atlántico después de la esmoltificación (Fraser *et al.*, 2012b). Los linfocitos B fueron más afectados por la ploidía que los neutrófilos, mostrando los salmones triploides valores más bajos de linfocitos B que los diploides. Sin embargo, en la mayoría de los estudios *in vivo* en

los que se han testado respuestas contra enfermedades comunes en diploides y triploides no se han observado efectos asociados a la ploidía o éstos han sido pequeños (Fraser *et al.*, 2012a).

En estudios de morfología celular, los peces triploides muestran un mayor porcentaje de irregularidades en los glóbulos rojos en comparación con los diploides. Es probable que el sistema inmune de los triploides esté más afectado por el estrés causado por altas temperaturas de cultivo (Fraser *et al.*, 2012a), alterando el mecanismo que controla la expresión génica extra en los triploides (Ching *et al.*, 2010). Además, los triploides poseen una menor capacidad para tolerar el estrés debido al menor número de eritrocitos, menor interconexión entre células y mayor volumen celular, lo que influye negativamente en la comunicación celular, en la transducción de señales y otros procesos como los movimientos celulares o el aumento en el consumo de oxígeno asociado con la activación de las células inmunes (Ballarin *et al.*, 2004).

Los peces triploides han demostrado una respuesta similar a la vacunación que los diploides en diferentes especies (Fraser *et al.*, 2012a). No se ha observado efecto de la ploidía en la producción de anticuerpos, la actividad del complemento, o la actividad fagocítica en ayu (*Plecoglossus altivelis*) vacunado contra *Vibrio* (Kusuda *et al.*, 1991). Tampoco se encontraron diferencias asociadas a la ploidía en trucha arcoíris vacunada contra *Vibrio* (Yamamoto & Iida, 1995c). Sin embargo, se encontró una interacción entre la ploidía y la vacunación en la morfología y funcionamiento del corazón de salmones de 18 meses de vida después de la vacunación, mostrando los corazones de triploides alteraciones ventriculares y un mayor volumen de trabajo en comparación con los diploides (Fraser *et al.*, 2015).

Varios experimentos toxicológicos sugieren que los triploides son más resistentes a los trastornos producidos por carcinógenos que los diploides (Thorgaard *et al.*, 1999; Arana *et al.*, 2002). Se cree que esto puede ser debido a las copias adicionales de genes de supresión tumoral y su consecuencia podría ser una mayor tolerancia de los triploides a los contaminantes antropogénicos en comparación con los diploides de la misma especie (Fraser *et al.*, 2012a).

Se sabe que los triploides son menos agresivos que los diploides durante la etapa juvenil (Fraser *et al.*, 2012a). Este comportamiento diferente podría explicar los datos de bajas tasas de crecimiento (Thorgaard *et al.*, 1982; Galbreath *et al.*, 1994) y el incremento en la erosión de las aletas en triploides cuando se cultivan conjuntamente con diploides (Blanc *et al.*, 2005). Las razones para la explicación de esta menor agresividad pueden ser la reducida percepción

sensorial causada por el menor número de células en los órganos sensoriales (Swarup, 1959; Aliah *et al.*, 1990), los bajos niveles de hormonas esteroides en el plasma (Yamamoto & Iida, 1995) y el menor número de células en el sistema nervioso central en comparación con los diploides (Martínez-Ruíz *et al.*, 2009). Sin embargo, aunque los triploides parecen menos agresivos cuando se cultivan solos, esto no sucede en todas las ocasiones en las que se cultivan con los diploides (Wagner *et al.*, 2006; Garner *et al.*, 2008).

La aparición de deformidades esqueléticas en los peces triploides es una de las mayores restricciones para la expansión de la triploidía en la acuicultura (Taranger *et al.*, 2010). En algunas especies, los triploides muestran las mismas deformidades que los diploides pero con una mayor incidencia. Varios estudios han demostrado la mayor aparición de deformidades en la mandíbula inferior en salmones triploides comparados con los diploides (Benfey, 2001, Sadler *et al.*, 2001; Taylor *et al.*, 2013). Ha sido probado que un déficit de fósforo durante el cultivo del salmón induce la aparición de estas deformidades mandibulares tanto en diploides como en triploides, aunque el efecto es más pronunciado en triploides (Fjellidall *et al.*, 2011, 2015). También hay estudios sobre la mayor proporción de deformidades vertebrales en peces triploides en comparación con los diploides (Madsen *et al.* 2000; Fjellidall & Hansen, 2010; Grimmett *et al.*, 2011; Opstad *et al.*, 2013) (Fig. 1.3). Se demostró que en salmones triploides, las deformidades vertebrales son más acusadas en las familias que tienen un crecimiento más rápido, sugiriendo estos resultados que existe un componente genético en la susceptibilidad a estas malformaciones (Leclercq *et al.*, 2011).

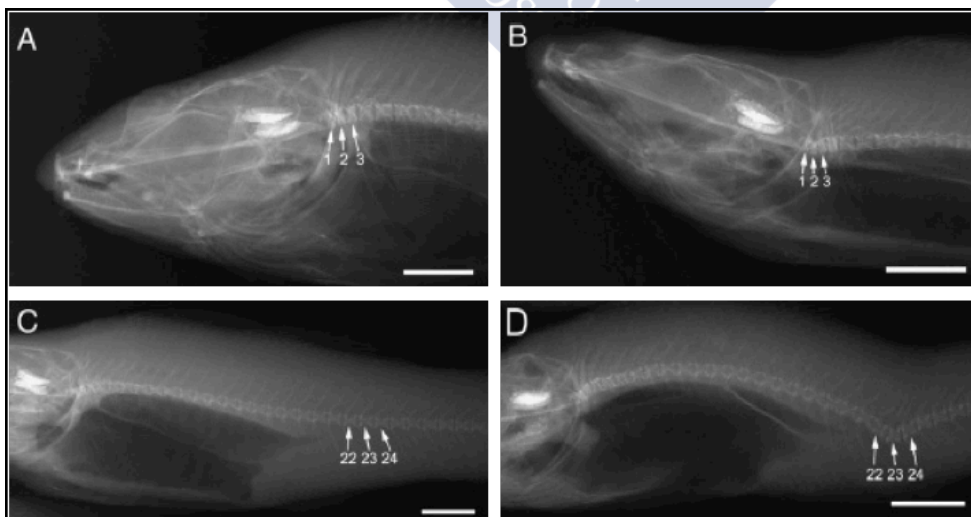


Fig. 1.3. Radiografías laterales de bacalao Atlántico (*Gadus morhua*) diploide con cuello normal (A), triploide con cuello curvado (B), diploide con columna vertebral normal (C) y triploide con lordosis (D). El número de las vértebras y el de los arcos neurales están indicados con flechas. Barra de escala=1,0 cm. Modificado de Opstad *et al.* (2013).

Los triploides poseen menor número y mayor tamaño de fibras musculares que los diploides en especies como el salmón Atlántico (Benfey, 1999; Johnston *et al.*, 1999; Bjornevik *et al.*, 2004) y trucha arcoíris (Poontawee *et al.*, 2007; Werner *et al.*, 2008), mostrando diferentes patrones de crecimiento muscular, con mayor hipertrofia en triploides y mayor hiperplasia en diploides (Fig.1.4).

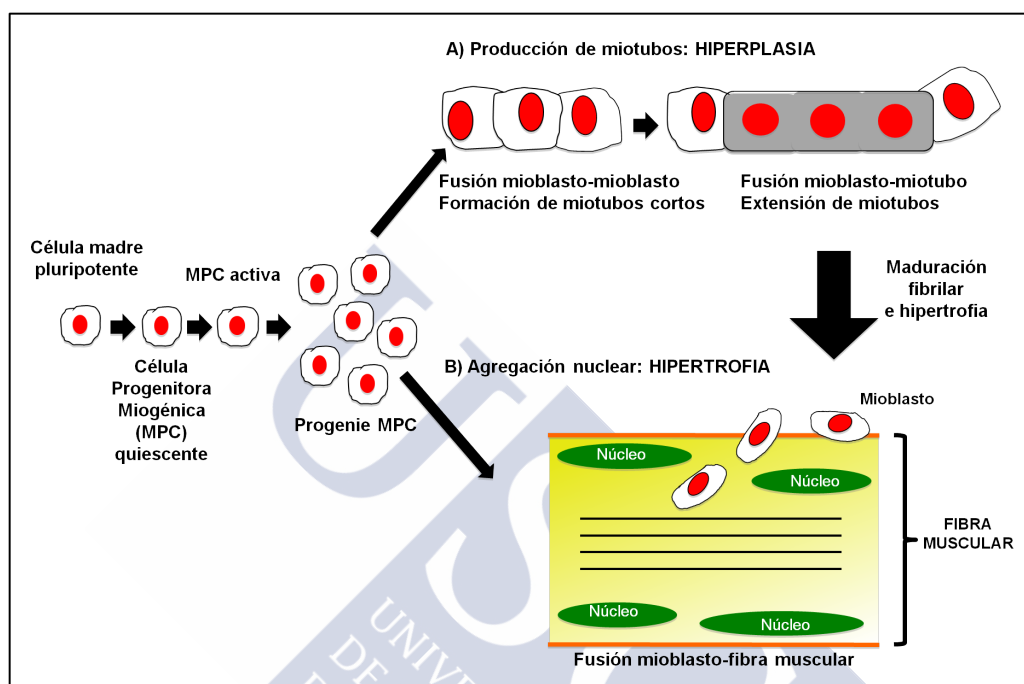


Fig. 1.4. Modelos de crecimiento del músculo esquelético de peces teleosteos. Modificado de Johnston (2006).

En este sentido, existen contradicciones en cómo estas diferencias en la celularidad muscular afectan a los parámetros de textura. En análisis realizados con filetes ahumados de salmón Atlántico diploides y triploides se observó una correlación positiva entre densidad de fibras y textura (Johnston *et al.*, 2000). Sin embargo, en otro estudio realizado con carne cruda de salmón Atlántico no se encontró relación entre el tamaño o densidad de fibras y textura, mostrando diploides y triploides unos valores similares en los parámetros de textura (Bjornevik *et al.*, 2004).

En cuanto a la composición química de la carne, hay muy pocos estudios publicados comparando diploides y triploides. En trucha arcoíris, diploides y triploides poseen una composición similar en proteínas y cenizas, sin embargo, los triploides contienen mayor cantidad de grasa y menor humedad que los diploides (Poontawee *et al.*, 2007). Sin embargo, en tilapia (*Oreochromis niloticus*) los triploides poseen los mismos contenidos de proteínas,

lípidos y humedad (Hussain *et al.*, 1995). Hasta la fecha, no se conocen los efectos de la triploidía sobre el perfil de ácidos grasos y la composición mineral de la carne.

1.2. LA TRIPLOIDÍA EN EL RODABALLO

El rodaballo (*Scophthalmus maximus*) es una especie de pez teleósteo de la familia *Scophthalmidae* y del orden de los Pleuronectiformes. Morfológicamente se engloba dentro del grupo de los peces planos, y se caracteriza por su forma circular y asimétrica, con ambos ojos en el lado izquierdo del cuerpo (FAO, 2009). Posee una piel sin escamas, con una coloración mimética y variable, parduzca en el dorso y blanquecina en el vientre. Es una especie dioica, que en la naturaleza se reproduce entre abril y agosto, según la latitud, y que realiza puestas secuenciales. Las larvas sufren un proceso de metamorfosis por el cual pasan de una simetría bilateral a una forma plana, viviendo en el fondo durante su fase juvenil y adulta. Son peces longevos, pudiendo alcanzar los 15 años y hasta 12 kg de peso. En la naturaleza es poco abundante y su área de distribución se extiende desde Noruega a lo largo de las costas de Inglaterra, Francia, España y Portugal hasta el norte de África, y en el mar Mediterráneo hasta el Mar Negro.

Es una de las especies que mejor cumple los criterios de evaluación de las especies de cultivo, como son un alto valor comercial, fácil reproducción, rápido crecimiento y disponibilidad de alimento barato (Jones, 1972). El conocimiento acerca del cultivo intensivo de esta especie, en lo que se refiere a la reproducción, fase larvaria y fases de engorde, está bien documentado (Cal, 2005). Su producción constituye una de las actividades más importantes para la acuicultura europea, habiendo alcanzado 7.721 Tm anuales en el año 2013 (APROMAR, 2014). España es con diferencia el líder en la producción europea de rodaballo con 6.814 Tm en 2013, lo que constituye el 88,3% de la producción total europea, siendo Galicia la principal comunidad autónoma en producción de esta especie con un 99% de la producción total española. Por lo tanto, Galicia se sitúa a la cabeza de la producción europea de rodaballo, constituyendo esta especie una de los principales recursos acuícolas de esta comunidad.

El dimorfismo sexual en el crecimiento del rodaballo se encuentra entre los más altos de los peces. Las hembras diploides de rodaballo alcanzan el tamaño comercial entre cuatro y seis meses antes que los machos, lo que explica el interés de la industria en la obtención de poblaciones formadas por hembras. Esta diferencia en el crecimiento contribuye a

incrementar las diferencias de peso entre individuos en las unidades de cultivo, lo que obliga a realizar una serie de desdoblamientos que implican mano de obra y un mayor manejo de los animales (Piferrer *et al.*, 2007). Además, en cultivo intensivo la maduración sexual ocurre en machos y parte de las hembras antes de alcanzar el tamaño comercial, lo que obliga a sacrificar a los animales a un peso menor del óptimo para evitar la ralentización del crecimiento y las mortalidades asociadas a la maduración sexual (Piferrer *et al.*, 2007).

La inducción de la triploidía en rodaballo se desarrolló con el fin de generar poblaciones estériles y así evitar los inconvenientes asociados a la maduración sexual. La esterilidad presupone que los peces mantengan una calidad de las partes comestibles constante, lo que facilitaría su comercialización en cualquier época del año, no produciéndose mortalidades asociadas a los periodos de reproducción (Piferrer *et al.*, 2007). Además, la producción de rodaballos triploides evitaría los riesgos de contaminación genética asociados a los escapes.

1.2.1. Inducción a la triploidía en el rodaballo

En el cultivo intensivo de rodaballo la maduración sexual se induce manipulando el fotoperiodo (Forés *et al.*, 1988). Los gametos se obtienen de cada individuo por masaje abdominal y la fertilización es artificial, por lo que la selección y manipulación de gametos forma parte de las técnicas habituales en el cultivo de la especie. La triploidía en el rodaballo se puede inducir aplicando choques térmicos fríos o calientes a huevos recién fertilizados. Vázquez *et al.* (1998) utilizaron choques térmicos calientes entre 25-31°C para inducir la triploidía, pero la supervivencia fue muy baja. Piferrer *et al.* (2000, 2003) desarrollaron un protocolo para inducir la triploidía en el rodaballo cultivado entre 13-14°C, aplicando choques térmicos próximos a 0°C para evitar la extrusión del segundo corpúsculo polar. La mejor combinación de parámetros para inducir la triploidía a gran escala se obtuvo aplicando un choque frío a los 6,5 min después de la fertilización, durante 25 minutos, manteniendo la temperatura entre -1 y 0°C. Con ese método se obtuvieron tasas de triploidía del 95-100%, con tasas de supervivencia del 60% respecto a los diploides. Las temperaturas por encima de 0°C, especialmente durante los primeros 5 minutos después de la fertilización, reducen la tasa de triploidía, y por debajo disminuyen la tasa de supervivencia (Piferrer *et al.*, 2000, 2003).

En la inducción por choque térmico frío, el momento de la aplicación del choque y la temperatura del mismo fueron similares a las utilizadas en otros peces planos marinos, pero la duración del choque fue más corta que la de otras especies como la platija o el fletán,

cultivados a temperaturas más bajas (Piferrer *et al.*, 2007). La supervivencia de los triploides después de la eclosión no fue significativamente distinta a la de los controles diploides (Piferrer *et al.*, 2000, 2003), aunque es difícil de cuantificar debido al elevado número de variables que afectan a la fase larvaria de cada cultivo. Esto sugiere que la menor supervivencia es más debida a un efecto mecánico de la manipulación que a la propia triploidía en sí (Piferrer *et al.*, 2007). En la inducción de la triploidía de especies marinas de elevada fecundidad, como el rodaballo, la mortalidad en la eclosión es relativamente poco relevante, por lo que en la aplicación de esta técnica es prioritario conseguir altas tasas de triploidía (Piferrer *et al.*, 2007).

Los choques fríos han sido utilizados con el mismo fin en otras especies de peces planos como la platija (Purdom, 1972), el lenguado (Howell *et al.*, 1995; Molina-Luzón *et al.*, 2015), fletán (Holmefjord & Refstie, 1997), hirame o falso fletán (*Paralichthys olivaceus*) (Yamamoto, 1999, You *et al.*, 2001) y lenguado de Florida (Luckembach *et al.*, 2004).

1.2.2. Verificación de la triploidía en el rodaballo

La reproductibilidad de la inducción a la triploidía tiene limitaciones y su éxito ha de ser determinado lo antes posible cada vez que se realice (Piferrer *et al.*, 2007). El método más preciso utilizado en rodaballo es el análisis del cariotipo, por el cual se ha determinado que su número diploide es 44 y su número triploides es 66 cromosomas (Bouza *et al.*, 1994; Piferrer *et al.*, 2000). Sin embargo, este análisis, debido a su duración y baja reproductibilidad en peces, no puede ser utilizado como técnica rutinaria en la identificación de triploides. La validación de la triploidía en rodaballo también ha sido realizada mediante la cuantificación de nucléolos por núcleo (NOR) (Piferrer *et al.*, 2000), por medición de la talla de eritrocitos (Piferrer *et al.*, 2003) y citometría de flujo (Vázquez *et al.*, 1996). Estas tres técnicas de verificación son invasivas, y las dos últimas requieren ejemplares de cierta edad con una cantidad apropiada de células sanguíneas para su análisis. Además, los dos últimos métodos mostraron cierto error debido al solapamiento de las distribuciones de diploides y triploides en las variables utilizadas.

La citometría de flujo es un método directo de cuantificación que puede ser utilizado para analizar con gran rapidez el contenido de ADN de un alto número de células con una precisión mayor muy elevada. Esta técnica es usada en producción animal y en la industria alimenticia (Piferrer *et al.*, 2009), sin embargo, el elevado coste del citómetro, así como la

formación especializada requerida, hacen que este método de determinación sea de difícil aplicación en explotaciones acuícolas (Piferrer *et al.*, 2007).

1.2.3. Efectos biológicos de la inducción a la triploidía en rodaballo

Hasta la fecha, se ha documentado que la triploidía en el rodaballo produce importantes cambios en la reproducción, el crecimiento después de la maduración sexual, la proporción de sexos y la hematología (Piferrer *et al.*, 2007). En los machos triploides los testículos son de forma semejante a los de los diploides aunque de menor tamaño, pero existen diferencias importantes en cuanto al proceso de maduración sexual. La meiosis no se interrumpe y se desarrolla actividad espermatogénica aunque con un ciclo de retraso. Así, en estudios histológicos hasta los dos años de edad, se observa el desarrollo de la espermatogénesis hasta la formación de espermátidas, pero no se observan espermatozoides (Terrones, 2002), que sin embargo pueden aparecer en machos de tres años aunque en muy baja frecuencia (Cuñado *et al.*, 2002). En ningún caso ha sido posible extraer espermatozoides de animales vivos, por eso aunque la esterilidad no sea completa, no hay duda de su nula capacidad reproductora (Cal *et al.*, 2006). En las hembras la triploidía provoca un bloqueo de la meiosis, la esterilidad es gonadal, los ovarios no se desarrollan apareciendo muy pequeños y de aspecto rudimentario, y los oocitos no evolucionan más allá del estado previtelogénico (Cal *et al.*, 2006) (Fig. 1.5). Además,

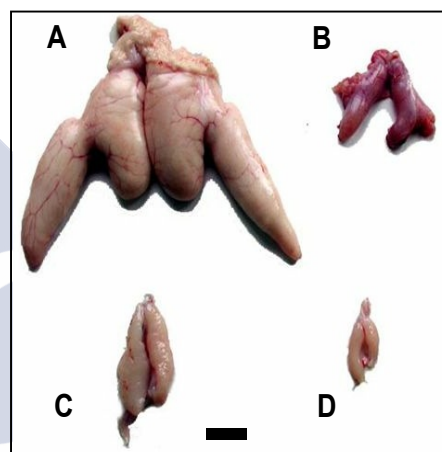


Fig. 1.5. Gónadas de rodaballos de 24 meses de edad. Diploide hembra (A), diploide macho (B), triploide hembra (C) y triploide macho(D). Barra de escala=2.4 cm. Modificado de Cal *et al.* (2006)

se ha observado que los triploides muestran una mayor incidencia de apoptosis durante el ciclo reproductivo en comparación con los diploides, mostrando machos y hembras triploides una mayor tasa de células apoptóticas, siendo esta tasa más marcada en las hembras (Cal *et al.*, 2010). Estos datos sugieren que la apoptosis juega un papel importante en el control del número de células germinales de triploides, sobre todo en las hembras.

Hasta la primera maduración sexual, los rodaballos triploides no se distinguen morfológicamente de sus homólogos diploides (Fernández-Pato *et al.*, 1998; Cal *et al.*, 2006) pero, como sucede en otras muchas especies, la maduración sexual marca un antes y un después en el modo de crecimiento (Piferrer *et al.*, 2007). A partir de la primera maduración

sexual, la tasa de crecimiento de los peces diploides está regulada por los ciclos anuales de reproducción, con incrementos rápidos de peso antes de las puestas debidos a un gran aumento del peso de sus gónadas, seguido de pérdidas de ese peso ganado tras las puestas. Este efecto es mucho más acusado en las hembras. En cambio en los triploides, debido a su esterilidad, el crecimiento es prácticamente regular y continuado (Cal *et al.*, 2006).

La triploidía inducida por choque térmico frío afecta la proporción de sexos en el rodaballo produciendo, en la mayoría de los casos, un aumento en el número de hembras que, al igual que en el caso de los diploides, alcanzan un peso mayor que los machos triploides (Imsland *et al.*, 1997). Descartada por poco probable una distinta mortalidad entre sexos en estadios tempranos, la causa más probable es la doble dotación genómica materna (Benfey *et al.*, 1999), debido a que la progenie triploide recibe dos juegos de cromosomas de la madre y uno del padre, lo que podría afectar a las proporciones sexuales. Entender el mecanismo de determinación sexual y la influencia de la ploidía sobre el mismo, podría permitir el desarrollo de métodos libres de hormonas para producir poblaciones de un solo sexo para el cultivo del rodaballo (Imsland *et al.*, 1997; Piferrer *et al.*, 2004).

Estudios de asociación a nivel genómico y de detección de QTLs (*Quantitative Trait Loci*) sugieren la existencia de una región principal del genoma implicada en la determinación del sexo en rodaballo (Martínez *et al.*, 2009). Los patrones de segregación de los marcadores más cercanos a la región de determinación sexual en rodaballo apoyan un mecanismo ZZ / ZW (Haffray *et al.*, 2009; Martínez *et al.*, 2009), al igual que las proporciones sexuales en progenies de progenitores revertidos hormonalmente (Haffray *et al.*, 2009). Este mecanismo encaja bien con la proporción de sexos (1 M: 3 H) observada por Cal *et al.* (2006) en la mayoría de los grupos de rodaballos triploides inducidos a la triploidía por choque térmico frío, con diferencias significativas entre ploidías y con respecto a la descrita anteriormente para diploides (1 M: 1 H) por Imsland *et al.* (1997). Al igual que en los diploides, las hembras triploides alcanzan un peso mayor que los machos triploides (Imsland *et al.*, 1997).

De acuerdo con el mapeo fino de la región determinante del sexo obtenido en el estudio de Martínez *et al.* (2009), el gen determinante del sexo en rodaballo estaría en 32,2 cM de los centrómeros. Esto haría que en los triploides la mayoría de los descendientes fuesen hembras (Hembras: 64,4% ZZW, 17,8%; ZWW y machos: 17,8% ZZZ), asumiendo la dominancia del cromosoma W y la viabilidad normal de individuos que contengan WW. Sin embargo, Pradeep *et al.* (2012) observaron en triploides de tilapia roja distintas proporciones de sexos

según la inducción a la triploidía fue realizada por choque térmico frío o caliente. Además, en algunas familias triploides de rodaballo se ha observado un exceso de machos con proporciones cercanas a dos machos por cada hembra (R. Cal, comunicación personal).

Taboada *et al.* (2014) han confirmado un sistema de segregación ZZ / ZW en rodaballo, analizando un número mucho mayor de marcadores que en trabajos anteriores (Martínez *et al.*, 2009), pero sugieren la existencia de factores genéticos menores o ambientales, responsables de las discordancias observadas entre los marcadores genéticos y el sexo fenotípico, por lo que un análisis detallado de la temperatura durante el período de desarrollo larvario en rodaballo podría facilitar una mejor comprensión de la posible influencia en la proporción de sexos.

En relación a la hematología, los eritrocitos de los rodaballos triploides son de mayor tamaño que los diploides, de forma elipsoidal y presentan mayor frecuencia de anormalidades, como la segmentación nuclear o la presencia de micronúcleos. Paralelamente al aumento de volumen de los eritrocitos, los rodaballos triploides muestran respecto a los diploides una reducción en su número, lo que se traduce en un valor de hematocrito menor y niveles de concentración de hemoglobina son más bajos. Los rodaballos triploides toleran con más dificultad los niveles bajos de oxígeno en el agua, por lo que presentan menor capacidad de resistencia a condiciones de hipoxia aguda que los diploides, posiblemente debido a una menor capacidad de utilización del oxígeno a bajas concentraciones (Cal *et al.*, 2005). Aunque esta limitación pueda no ser un obstáculo para el cultivo de rodaballos triploides, sí puede suponer el menor bienestar de estos peces y repercutir en su rendimiento de cultivo (Piferer *et al.*, 2007).

Los rodaballos triploides tienen un menor número de leucocitos que los diploides, pero con una actividad celular mayor. La respuesta innata humoral y celular de los triploides no parece estar afectada, lo que sugiere que los triploides deberían tener una resistencia a las enfermedades similar a los diploides (Budiño *et al.*, 2006).

1.3. JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO

La inducción a la triploidía es, hoy en día, una técnica totalmente estandarizada y fácil de implementar en los sistemas de producción, pudiendo ser una alternativa interesante para la producción de rodaballos de un tamaño mayor al que se comercializa en la actualidad (2 kg de peso), en cultivo intensivo y en jaulas (Cal, 2005). Esta técnica se ha aplicado a grandes

volúmenes de huevos con eficiencias próximas al 100% y viabilidades ligeramente por debajo de los controles diploides (Piferrer *et al.*, 2003). Además, la inducción de la triploidía en rodaballo presenta la ventaja de obtener, en la mayoría de los casos, un mayor porcentaje de hembras (el género con mayor crecimiento) en la descendencia (Cal *et al.*, 2006), por lo que los stocks formados por triploides alcanzan una mayor biomasa que los diploides a una edad determinada (Piferrer *et al.*, 2009). Sin embargo, aunque diploides y triploides son similares en muchos aspectos fisiológicos, los triploides presentan diferencias fundamentales en la organización celular, lo que afecta a su fisiología y comportamiento en comparación con los diploides (Fraser *et al.*, 2012a).

Hasta la fecha, se han descrito los efectos fisiológicos de la inducción a la triploidía en rodaballo sobre el crecimiento (Cal *et al.*, 2006), la reproducción (Terrones *et al.*, 2002; Cal *et al.*, 2006; Cal *et al.*, 2010), la proporción de sexos (Cal., 2005), el sistema inmune innato (Budiño *et al.*, 2006), y la hematología (Cal *et al.*, 2005). Sin embargo, todavía quedan por conocer aspectos importantes relacionados con el efecto de la triploidía sobre las características del producto final como son la incidencia de malformaciones corporales, ya descritas el rodaballo de cultivo (Ellis *et al.*, 1997), así como la incidencia en la tasa de deformidades en los órganos internos y en la estructura esquelética, que condicionan el bienestar de los peces y la buena aceptación por parte de los consumidores (Baeverfjord *et al.*, 2009). Estas malformaciones son frecuentes en otras especies de peces inducidas a la triploidía (Piferrer *et al.*, 2009; Fraser *et al.*, 2012a).

Otro aspecto a conocer es la estructura muscular de los rodaballos triploides, que determina la calidad de la carne. En algunas especies de peces inducidos a la triploidía, como la trucha (Werner *et al.*, 2008) y el salmón (Johnston *et al.*, 1999), el nivel ploidía influye en la celularidad muscular y la textura, así como en la composición bioquímica, lo que incide directamente en las condiciones organolépticas del producto final.

Tampoco existen estudios relacionados con el efecto de la triploidía sobre la eficiencia de la respuesta inmune específica en el rodaballo, proceso clave en la respuesta a infecciones y vacunas. Existen algunas discrepancias acerca de la resistencia de los peces triploides tras la estimulación con diferentes patógenos (Jhingan *et al.*, 2003; Ozerov *et al.*, 2010; Frenzl *et al.*, 2014), y en estudios recientes realizados con salmón se han detectado diferencias en la expresión de genes relacionados con el sistema inmune entre peces diploides y triploides

durante las infecciones con *Vibrio anguillarum* (Ching *et al.*, 2010) y *Piscirickettsia salmonis* (Correa *et al.*, 2014).

Por otro lado, observando las limitaciones de cada uno de los métodos de verificación de la ploidía en rodaballo, se consideró necesario disponer de una técnica que fuese sencilla, rápida, reproducible, no invasiva y rentable para la identificación de los rodaballos triploides. El método debería ser de fácil implementación por las empresas de acuicultura, pudiendo incorporar el protocolo de verificación a sus líneas de producción.

El presente trabajo aborda el diseño de una nueva herramienta para la verificación de la ploidía en rodaballo, para luego analizar algunas implicaciones biológicas de la inducción a la triploidía sobre aspectos relacionados con el sistema inmune específico, las deformidades corporales, la celularidad muscular, la calidad de la carne y el deterioro muscular *post mortem* del rodaballo, con el fin de evaluar el rendimiento de los triploides y contribuir a valorar la posibilidad de su cultivo a escala comercial.







2. OBJETIVOS



2. OBJETIVOS

La técnica de inducción a la triploidía en rodaballo se encuentra ya optimizada para su posible implementación en la industria acuícola. Sin embargo, es escaso el conocimiento sobre la respuesta fisiológica de los rodaballos triploides con respecto a los diploides. Además, no existe una metodología sencilla, versátil y precisa para evaluar el nivel de ploidía que pueda ser integrada en los procesos de producción. El presente trabajo tiene como objetivo principal:

- Mejorar el conocimiento sobre los efectos biológicos y la verificación de la triploidía en rodaballo como contribución para evaluar el cultivo de triploides a escala comercial.

Este objetivo se subdivide en cinco objetivos concretos que se recogen en cinco publicaciones científicas y estructuran la memoria de la tesis:

- Desarrollar y testar una nueva herramienta para la verificación de la triploidía basada en la utilización de marcadores moleculares microsatélites, de fácil implementación por las empresas de producción.
- Estudiar el efecto de la triploidía en la susceptibilidad a la apoptosis en leucocitos de rodaballo y sus consecuencias en la respuesta inmune específica.
- Estudiar el efecto de la triploidía sobre la incidencia de malformaciones corporales y esqueléticas en rodaballo y sus consecuencias sobre la calidad y el valor del producto final.
- Estudiar el efecto de la triploidía sobre la celularidad muscular y su composición físico-química en rodaballo y sus consecuencias en la calidad de la carne.
- Estudiar el efecto de la triploidía sobre la degradación post-mortem de la musculatura en rodaballo y sus consecuencias para el procesado de la carne.





3. METODOLOGÍA



3. METODOLOGÍA

Esta memoria de tesis doctoral se presenta como un compendio de artículos de investigación o publicaciones científicas (capítulo 4) donde en cada artículo o subcapítulo se describen específicamente la metodología y los análisis empleados para la consecución de los objetivos planteados. Por lo tanto, este capítulo metodológico sólo hace referencia a aspectos comunes sobre la generación del material biológico.

3.1. CONSTITUCIÓN DEL STOCK DE REPRODUCTORES

El stock de reproductores de rodaballo utilizado para el desarrollo de esta tesis doctoral fue formado a partir de un grupo de rodaballos adultos estabulados en el Instituto Español de Oceanografía (IEO) de Vigo. Dado que las técnicas de manipulación cromosómica son muy agresivas con los gametos, se trató de conseguir un stock de reproductores con las mejores condiciones fisiológicas, seleccionando aquellos ejemplares de los cuales se podían obtener gametos de alta calidad. Además, se realizó un análisis genético que se centró en evaluar las relaciones de parentesco (estructura familiar) entre los reproductores del nuevo stock. El evitar apareamientos consanguíneos entre los reproductores, y mejorar por tanto la eficiencia de la producción en los trabajos experimentales, depende del conocimiento de la estructura familiar del stock (Toro & López-Fanjul, 1998). La importancia de este análisis está directamente relacionada con la consecución de parámetros de fecundidad, fertilidad y variabilidad adecuados en el manejo de los reproductores.

La cuantificación de la diversidad genética es un parámetro estimado habitualmente en cualquier plan de producción, pues permite estimar la respuesta a la selección en un plan de mejora, ya que niveles de diversidad genética bajos pueden provocar problemas en relación con las características reproductivas de un stock, o con la viabilidad del mismo y de sus progenies. Por otro lado, los marcadores genéticos aplicados para este análisis, los loci microstélite, son marcadores hipervariables, que mediante la aplicación de los test estadísticos apropiados, permiten establecer los coeficientes de parentesco, y desvelar la existencia de grupos familiares de hermanos completos o medios hermanos con elevada fiabilidad (Queller & Goodnight; 1989, Estoup *et al.*, 1998). Los loci microsatélite analizados presentan gran

variabilidad genética, por lo que resultan idóneos para los estudios de diversidad genética y análisis de parentesco en rodaballo.

Para la fundación del nuevo stock de reproductores de rodaballo fueron seleccionados 42 individuos (peso y talla media de 46,2 cm y 2.182 g, respectivamente), de los que se obtuvo una muestra de tejido de la aleta caudal. El ADN de los individuos del stock fue purificado mediante la resina Chelex® 100 (Biorad Labs, Richmond, CA), a partir de tejido de aleta (Walsh *et al.*, 1991). Se utilizó este método debido a su simplicidad, rapidez y bajo coste; además precisa de cantidades mínimas de tejido de partida, lo que permite muestreos no invasivos. Este ADN se utilizó para la amplificación mediante la técnica de la PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa), necesaria para el genotipado de microsatélites. Posteriormente se comprobó que la amplificación fue correcta mediante electroforesis en gel de agarosa. Finalmente, se procedió al análisis de los fragmentos de los loci amplificados utilizando un secuenciador automático. Las secuencias de los cebadores que se utilizaron para amplificar específicamente a los distintos loci se detallan en la Tabla 3.1. Para poder detectar los fragmentos amplificados en el secuenciador automático, uno de los cebadores específicos de cada locus se marcó con un fluoróforo sensible al haz del láser de los detectores del secuenciador.

Tabla 3.1. Características de los 6 loci microsatélite analizados

LOCUS	CEBADORES (5'→3')	UNIDAD DE REPETICIÓN
Smax-02	GGAGGATGTATTGAAAGTGT AGAGCAGGTCATTATACAGC	(TG) ₁₆
Smax-04	TCACAAAATCTGAACATCGGT GTAATCCACCAAAGTGAACG	(TG) ₂₀
Sma3-8INRA	CCCTCCGTCAGACAAAGAG GACGAAGTTAATGTTTCATTG	(GT) ₁₈ -(CT) ₅
Sma3-12INRA	CACAATTGAATCACGAGATG GCCACCACTCGCTAACAC	(TG) ₂₁
4/5CA22/6/2	ACTCTGAGGGCAGAGGAAC GCTGCTGGTAATCAGAAAGC	(CA) ₂₂ CT(CA) ₆ CT(CA) ₂
3/3GT	GATCTAGTTGTCTAACAGG ATAGCAGGTCCTGCTAAAG	(GT) ₁₄ GC(GT) ₈ (TG) ₄ T(TG) ₃

De modo general, para cada muestra analizada se preparó una mezcla de reacción de PCR, combinando cebadores para varios microsatélites, es lo que se conoce como reacción multiplex. En nuestro caso se utilizó una multiplex de cuatro microsatélites y otra de dos, en

un volumen total de 45 y 30 μL , respectivamente. La mezcla preparada incluía el ADN de la especie (1,5 μL) y diversos reactivos (tampón, dNTPs, dos cebadores para cada microsatélite, MgCl_2 , Taq polimerasa), así como agua mili-Q autoclavada para completar el volumen final de reacción. El tampón de amplificación utilizado fue GoldBuffer 10X (Applied Biosystems: 15 mM Tris-HCL, pH 8, 50 mM KCl), en una concentración del 10%. Los dNTPs (desoxiribonucleótidos trifosfato) necesarios para la síntesis de ADN se usaron en concentraciones de 100 mM. La ADN polimerasa empleada en la reacción fue AmpliTaq Gold (Applied Biosystems) de tipo recombinante “hot start” (inicio de extensión a 72°C). En la Tabla 3.2 se detallan las cantidades de los reactivos utilizadas para cada multiplex.

La amplificación se llevó a cabo en termociladores PTC-100 (MJ Research) y las etapas realizadas fueron: a) un paso inicial de desnaturalización a 95°C durante 10 min; b) 35 ciclos que incluyeron un paso de desnaturalización a 94°C durante 45 s, 50 s a la temperatura de asociación de 54°C (multiplex de 4 microsatélites) ó 60°C (multiplex de 2 microsatélites), y una extensión a 72°C durante 50 s; c) una extensión final a 72°C durante 10 min.

La determinación precisa del tamaño de los fragmentos de ADN microsatélite se llevó a cabo mediante electroforesis de alta resolución en un secuenciador automático. Para la realización de este trabajo se empleó un secuenciador basado en electroforesis capilar ABI PRISM 3730 GENETIC ANALYSER (Applied Biosystems). Consta de 96 capilares que operan en paralelo y de un sistema de detección por láser de cinco fluoróforos. Todos los datos fueron recogidos y analizados por un ordenador a través del software GeneScan Analysis.

Tabla 3.2. Cantidades de reactivos utilizadas en las PCRs.

MULTIPLEX DE 4 MICROSATÉLITES	
Buffer	4,5 μl
Mg 25 mM	2,7 μl (1,5 mM final)
Dntps 2 mM	2,25 μl (100 μM final)
M2.F (5 pmoles)	0,1 μl
M2.R (5 pmoles)	0,1 μl
M4.F (5 pmoles)	0,1 μl
M4.R (5 pmoles)	0,1 μl
M8.F (5 pmoles)	0,1 μl
M8.R (5 pmoles)	0,1 μl
M12.F (5 pmoles)	0,1 μl
M12.R (5 pmoles)	0,1 μl
TAQ (5 u/ μl —1,5u)	0,3 μl
miliQ	34,45 μl
MULTIPLEX DE 2 MICROSATÉLITES	
Buffer	3 μl
Mg 25 mM	1,8 μl (1,5 mM final)
Dntps 2 mM	1,5 μl (100 μM final)
M 3/3-F (20 pmoles)	0,4 μl
M 3/3-R (20 pmoles)	0,4 μl
M 4/5-F (5 pmoles)	0,1 μl
M 4/5-R (5 pmoles)	0,1 μl
TAQ (5 u/ μl —1u)	0,2 μl
miliQ	22,5 μl

Los loci microsatélite son codominantes, de manera que se pueden identificar todos los genotipos a partir de la lectura de los geles. Para los homocigotos el único alelo se expresa en forma de una banda o pico y para los heterocigotos aparecen dos bandas o picos. La nomenclatura de los alelos de los loci microsatélites viene definida por su tamaño en pares de bases, que es en función del número de veces que contienen su unidad de repetición a lo largo del fragmento y la distancia de los cebadores empleados a la región de las repeticiones.

Una vez obtenidos los genotipos correspondientes a los 42 individuos para los 6 loci microsatélite analizados, a partir de estos datos y mediante la utilización del programa KINGROUP (Konovalov *et al.*, 2004) se realizó un análisis de parentesco para obtener la matriz de coeficientes de parentesco (R) estimados para todos los pares de individuos analizados en el stock (Tabla 3.3). Coeficientes iguales o menores que 0 representan individuos no emparentados, mientras que coeficientes positivos indican un grado de parentesco progresivamente mayor: $R=0,25$: medios hermanos; $R=0,5$: hermanos completos.

Estos resultados de parentesco fueron tenidos en cuenta, en la medida de lo posible, a la hora de realizar los cruzamientos entre reproductores para generar las familias de rodaballo utilizadas en esta tesis, tratando de cruzar ejemplares que hubieran obtenido valores de coeficiente de parentesco negativos y así disminuir las probabilidades de parentesco.

3.2. INDUCCIÓN A LA TRIPLOIDÍA

De los reproductores disponibles, se seleccionaron aquellos machos que presentaron esperma con alta concentración y con una movilidad elevada y duradera, y las hembras con puestas regulares y de buena calidad. Cuando las hembras están en época de puesta, normalmente los machos están fluyentes, emitiendo esperma al presionar ambos testículos en dirección al poro genital. Para la toma de muestras basta con ejercer una suave presión y recoger el esperma con una jeringa de 1 mL (desprovista de aguja). Para estos experimentos sólo se utilizó el esperma que mostraba alta concentración y una movilidad por encima de 4 en una escala de referencia (Sánchez-Rodríguez, 1975).

En el caso de las hembras, el inicio de la maduración fue claramente visible por el aumento del tamaño del ovario, que produce dilatación de la zona abdominal de forma progresiva según va alcanzando los diferentes estadios de madurez. Durante este proceso de maduración se realizó un seguimiento individual para cada hembra y, una vez comenzada la puesta, se determinó su ritmo de ovulación (2-3 días) para extraer la puesta por presión abdominal. La calidad de la puesta fue valorada en base a la potencialidad de los ovocitos para producir larvas viables (Kjorsvik *et al.*, 1989). Esta valoración se realizó en función de la esfericidad, la opacidad y el porcentaje de ovocitos sobremaduros.

Una vez los gametos fueron obtenidos y su calidad valorada, se llevó a cabo la fecundación artificial y, a continuación, la inducción a la triploidía según Piferrer *et al.* (2000, 2003). Los ovocitos fueron divididos en dos grupos de igual volumen en dos recipientes, utilizando uno de ellos para inducir triploidía (T) y el otro como grupo control (C). La fertilización se realizó añadiendo a ambos grupos el mismo volumen de esperma e inmediatamente después, una pequeña cantidad de agua para activar la movilidad del mismo (2 vol de agua de mar por 1 vol de ovocitos). Después de 30 s de suave agitación, se añadió agua de mar a 13-14°C hasta obtener un volumen de 200 cc y se esperó 6.5 min. En ese momento, el contenido del grupo C fue volcado en un incubador a 13-14°C para iniciar la incubación. El grupo T fue al que se le aplicó la inducción a la triploidía mediante choque térmico frío. Para ello, se transfirió el contenido a un vaso de cristal de 2 L que contenía 1.5 L a -2°C, permaneciendo a esta temperatura 25 min. Esta temperatura se consiguió mediante la introducción del vaso de agua en una cubeta plástica que contenía hielo y sal marina, consiguiendo de esta forma bajar el punto de congelación y obteniendo los -2°C sin que el

agua se llegase a congelar (Fig. 3.1). Al finalizar el choque, se transfirió el contenido del vaso a un incubador en condiciones similares al grupo control.

La temperatura, que fue controlada por un termómetro de precisión, ascendió hasta 1.5°C inmediatamente después de iniciar el choque, pero enseguida volvió a descender hasta 0°C y así permaneció hasta el final del tratamiento. Cuando la temperatura del choque sube de 0°C , el porcentaje de triploidía alcanzado disminuye y si, por el contrario, la temperatura es demasiado baja, disminuye la supervivencia.

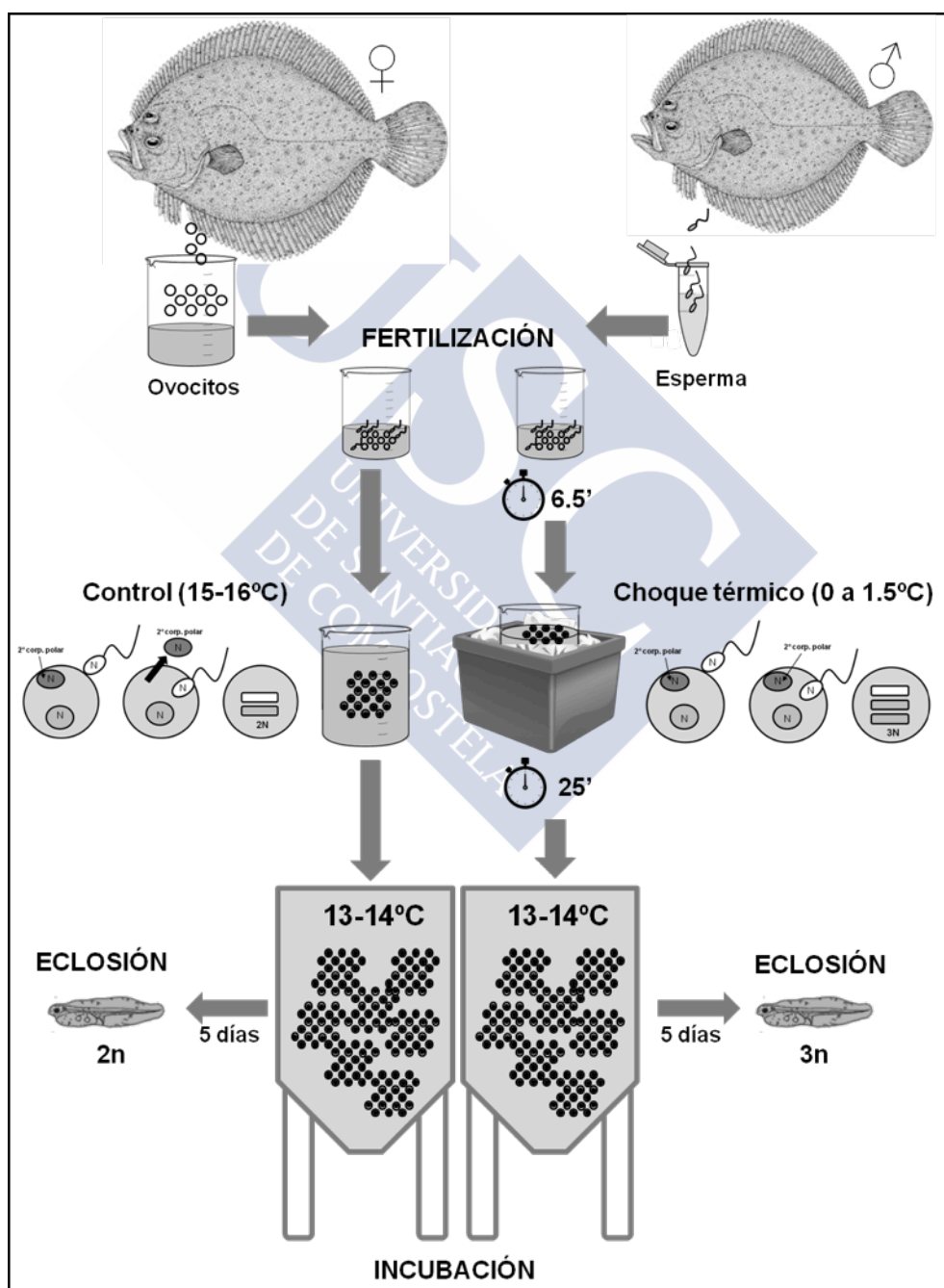


Figura 3.1. Esquema del protocolo utilizado para la inducción a la triploidía en rodaballo.

3.3. CONFIRMACIÓN DE LA TRIPLOIDÍA

La incubación de los huevos fecundados se realizó en tanques cilindrocónicos de poliéster de 120 l de capacidad, con circuito abierto de agua filtrada a 1 micra, a una temperatura de 14-15°C y aireación constante. La densidad de incubación nunca superó los 5000 huevos/L, para evitar daño a los huevos.

A las tres horas fueron perfectamente visibles las primeras divisiones celulares y se calculó el porcentaje de fecundación, en función del número de huevos con divisiones celulares en un total de 100 huevos. En este punto, se desecharon aquellas familias en las que los huevos fecundados presentaron irregularidades en las divisiones celulares y/o bajas tasas de fecundación.

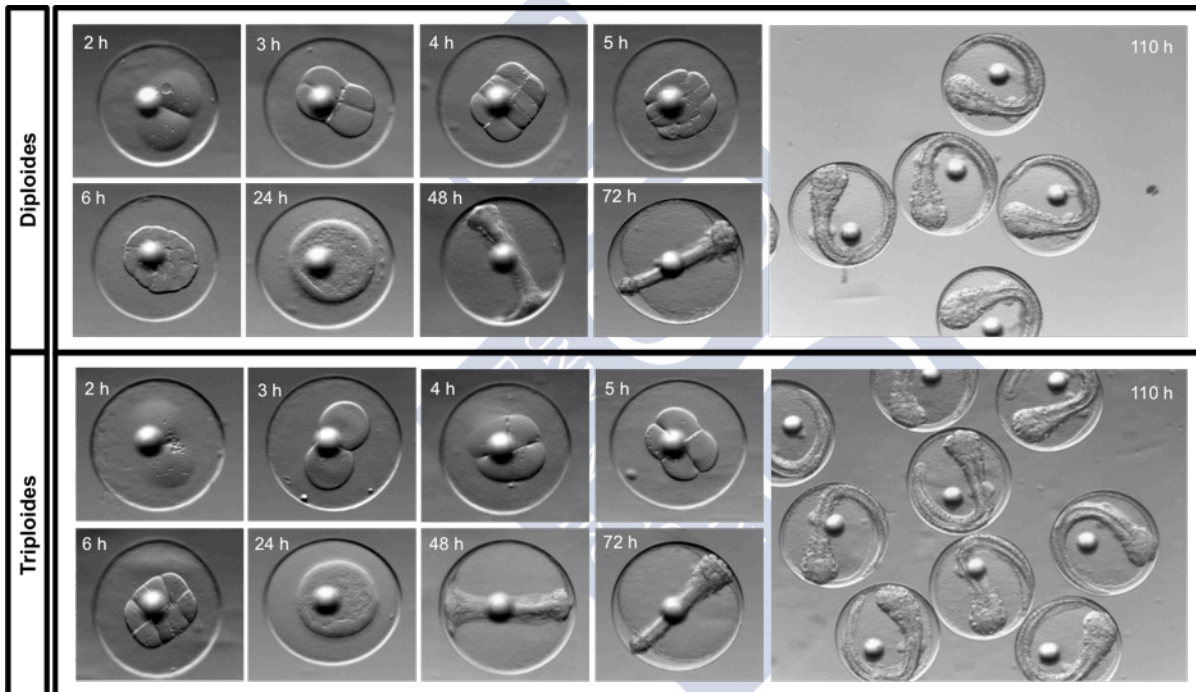


Fig.3.2. Desarrollo embrionario de rodaballos diploides y triploides incubados a 14-15°C. En cada imagen se indica las horas de desarrollo embrionario tras la fecundación.

La eclosión de los huevos se produjo aproximadamente a las 120 h. Se observó un retraso en el desarrollo embrionario de los triploides, más evidente en las primeras divisiones celulares hasta las 10 h tras la fertilización (Fig. 3.2), y que concluyó con un retraso medio de 6 h en la eclosión de las larvas de los grupos triploides con respecto a los diploides (datos no publicados). Este retraso en el desarrollo podría estar relacionado con la ralentización de los procesos de división celular durante la aplicación del choque térmico frío para impedir la extrusión del segundo corpúsculo polar.

Además, durante la fase de incubación de las familias triploides se observó un mayor porcentaje de irregularidades en las divisiones celulares, siendo frecuentes las divisiones asimétricas. También se observó un mayor número de embriones no viables en estadios más avanzados del desarrollo (datos no publicados). (Fig. 3.3). La interrupción del desarrollo embrionario puede estar relacionada con una mayor tasa de apoptosis en los embriones triploides. Magadán *et al.* (2009) observaron que los embriones triploides presentan un mayor retraso en el ciclo celular y una mayor tasa de apoptosis a las 48 horas tras la fertilización, lo que podría tener un efecto negativo sobre la supervivencia durante el desarrollo embrionario.

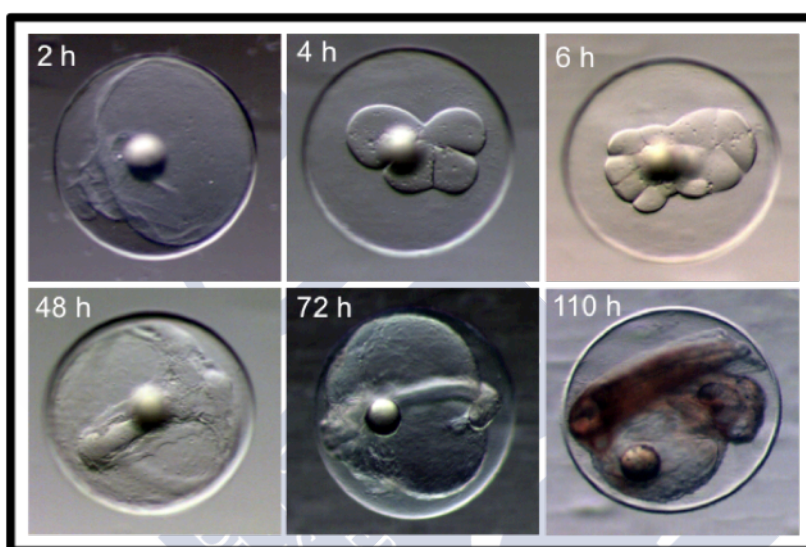


Fig.3.3. Irregularidades observadas en el desarrollo embrionario de rodaballos triploides. h: horas tras la fecundación.

Durante esta fase de incubación se recogieron un total de 100 huevos fecundados (48-72 h) de cada una de las familias generadas para proceder a la evaluación del nivel de ploidía mediante citometría de flujo. Para ello, se depositaron entre 10-15 huevos de cada familia y ploidía en un tubo de 1,5 mL y se lavaron dos veces mediante centrifugación en tampón fosfato salino estéril (PBS). Tras los lavados, los huevos fueron transferidos a un filtro en el que, con ayuda del émbolo de una jeringuilla, fueron presionados para obtener una suspensión celular. El número y viabilidad celular se determinó bajo un microscopio óptico mediante recuento con Azul Tripán en una cámara de Neubauer. Una vez cuantificadas las células, $5 \cdot 10^5$ células (en 500 μ L) fueron incubadas en presencia de 50 μ L de una solución de Ioduro de Propidio (1 mg/L), 0,02% Tritón X-100 RNA (1mg/mL). La fluorescencia celular fue analizada mediante un citómetro de flujo FC500, Beckman Coulter, Ca; USA y el programa WinMDI 2.9 (Trotter, 2000). Para confirmar la triploidía se determinó la intensidad de

fluorescencia media (GMean) de cada muestra, calculándose posteriormente la ratio entre la GMean de la muestra problema y la GMean obtenida con los embriones diploides. Se consideraron embriones triploides aquellos en los que la ratio $\approx 1,5$. La eficiencia del tratamiento se calculó mediante la proporción relativa de cada tipo de ploidía presente en la muestra, manteniéndose el cultivo siempre y cuando la proporción de individuos diploides no fuera superior al 5%.

El índice de eclosión fue calculado en función del número de larvas eclosionadas con respecto al número de huevos incubados. Las larvas recién eclosionadas fueron mantenidas en los incubadores mientras se alimentaron de forma endógena de su saco vitelino. A las 75 h de la eclosión las larvas habían consumido el vitelo y comenzó el proceso de apertura de la boca. En este momento, las larvas fueron transferidas a los tanques de cultivo larvario para el inicio de la alimentación exógena.

Para los diferentes artículos o subcapítulos de esta tesis doctoral se han realizado numerosos experimentos de inducción a la triploidía, generando en cada una de ellos familias de hermanos diploides y triploides, pero sólo fueron cultivadas aquellas familias en las que el porcentaje de fecundación fue elevado (mayor del 60%), no presentaron irregularidades en las divisiones celulares y el porcentaje de triploidía fue superior al 95% (Tabla 3.5.1.). En las 6 familias finalmente utilizadas, el porcentaje medio de fecundación en diploides fue 83% y 75% en triploides, y el valor medio de eclosión fue de 76% para los diploides y de 64% para los triploides (Tabla 3.4).

Tabla 3.4. Familias de rodaballos triploides generadas.

Familias de rodaballos triploides generadas				
Familia	Fecha	% 3n	% Fecundación	% Eclosión
I	11-03-09	100	80 (2n) 66 (3n)	73 (2n) 68 (3n)
II	02-06-09	96	87 (2n) 80 (3n)	81 (2n) 62 (3n)
III	12-06-09	97	84 (2n) 78 (3n)	75 (2n) 63 (3n)
IV	19-04-10	100	82 (2n) 75 (3n)	75 (2n) 64 (3n)
V	21-05-10	97	91 (2n) 82 (3n)	83 (2n) 66 (3n)
VI	09-03-11	96	77 (2n) 70 (3n)	70 (2n) 58 (3n)

3.4. CONDICIONES DE CULTIVO

Una vez eclosionadas las larvas se inició el cultivo larvario de ambos grupos de ploidía por duplicado, 2 tanques con larvas triploides y otros dos con larvas diploides. El volumen de los tanques de cultivo larvario fue de 1.000 L y la densidad inicial de larvas fue de 30 larvas/L. Los tanques de cultivo larvario fueron de poliéster cilindrocónicos con una pendiente del 3% hacia un desagüe central (Fig. 3.4). La temperatura de los cultivos se mantuvo entre 18 y 19°C. La intensidad de luz fue de 2000 lux en superficie con fotoperiodo continuado de 24 h. En el medio



Fig. 3.4. Tanque de cultivo larvario de 1.000 L.

de cultivo se añadió *Isochrysis galbana* a una densidad de 150.000 células/mL y *Nannochloropsis gaditana* a una densidad de 750.000 células/mL, manteniendo estas densidades hasta el día 40 de vida. Estas microalgas fueron seleccionadas por su alto contenido en ácidos grasos poliinsaturados de la serie ω -3 (Watanabe, 1983).

La alimentación exógena de las larvas consistió en una primera fase de alimento vivo mediante rotífero (*Brachionus plicatilis*) durante los días 3 a 14 de vida y nauplius de *Artemia*

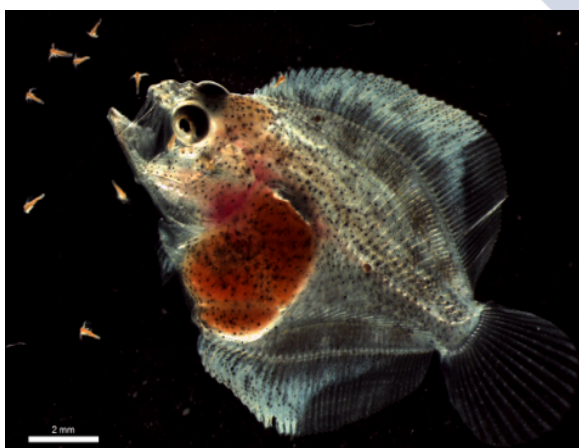


Fig.3.5. Larva triploide de 30 días de vida comiendo *Artemia*. Barra= 2 mm.

(A0) desde el día 8 de vida hasta el día 14, en el que se comenzó a utilizar *Artemia* de 24 h (A1) hasta el día 20, pasando en este momento a suministrar *Artemia* de 48 h (A2) hasta la fase de destete (Fig. 3.5). La alimentación inerte consistió en pienso de destete Gema Micro (Skretting, Burgos, España) y se inicia desde el día 30, solapándose con el suministro de *Artemia* A2 hasta el destete (a los 40 días de vida). El rotífero fue suministrado a las larvas

con una densidad de 5 rot/mL. Como enriquecedor del rotífero se utilizó *I. galbana*. La ración

diaria de rotífero se suministró en tres tomas, controlando en cada una de ellas la densidad de presas existente en los tanques de cultivo para reponer el número de presas consumido.

Los nauplius de *Artemia* (A0) se suministraron también en dosis diarias, a una densidad de 0,1 art/mL, solapándose con los últimos días de adición de rotífero. La densidad utilizada para *Artemia* de 24 h (A1) y de 48 h (A2) fue de 0,3-0,5 y 0,5 art/mL, respectivamente y siempre enriquecida previamente a su utilización con *I. galbana*. El circuito de agua permaneció cerrado hasta el día 8 de vida y, en ese momento, se abrió hasta que las larvas fueron destetadas (disponiendo los tanques de un desagüe lateral con malla de 62 µm). El flujo se ajustó en los tanques a 3.5 L/min. Diariamente se realizaron controles de temperatura, oxígeno disuelto, salinidad, amonio y nitritos.

Una vez destetadas, las larvas fueron transferidas inicialmente a tanques de alevinaje de 500 L (Fig. 3.6), después de 1.000 L y más tarde a tanques de engorde de 3.800 L provistos de circuito abierto de agua de mar. Desde este momento, los peces fueron cultivados bajo las condiciones naturales de fotoperiodo y temperatura. Los peces fueron alimentados diariamente, por medio de comederos automáticos con pienso seco comercial (Skretting) con una talla que fue incrementando hasta el inicio de cada experimento, en función del tamaño de



Fig.3.6. Tanque de alevinaje de 500 L.

la boca de los rodaballos. Fueron realizados muestreos regulares de talla y peso para controlar la densidad de los tanques durante el proceso de engorde. Además, todos los ejemplares fueron vacunados a los dos meses de edad contra *Vibrio* sp. mediante inmersión en Gava-3 (100 mL/L) (Laboratorios Hipra, Girona). Asimismo, fueron administrados baños periódicos de OX-CTA (50

mg/L) (Laboratorios OX, Barcelona) para prevenir la presencia de parásitos.

Por otra parte, a todos los peces diploides y triploides utilizados para realizar los experimentos de esta tesis se les diagnosticó, de forma individualizada, el nivel de ploidía. Cuando los ejemplares eran lo suficientemente grandes como para extraer una muestra de sangre (de la aleta caudal o del arco branquial), se utilizó como técnica de verificación de la ploidía la medición de los eritrocitos. Para ello, a la muestra de sangre se le aplicó una tinción Hemacolor (E. Merck, Darmstadt., Alemania) (Fig. 3.7) y fue medida la longitud media del

eje mayor de los eritrocitos (al menos 30 eritrocitos por individuo), como previamente fue descrito por Piferrer *et al.* (2003).

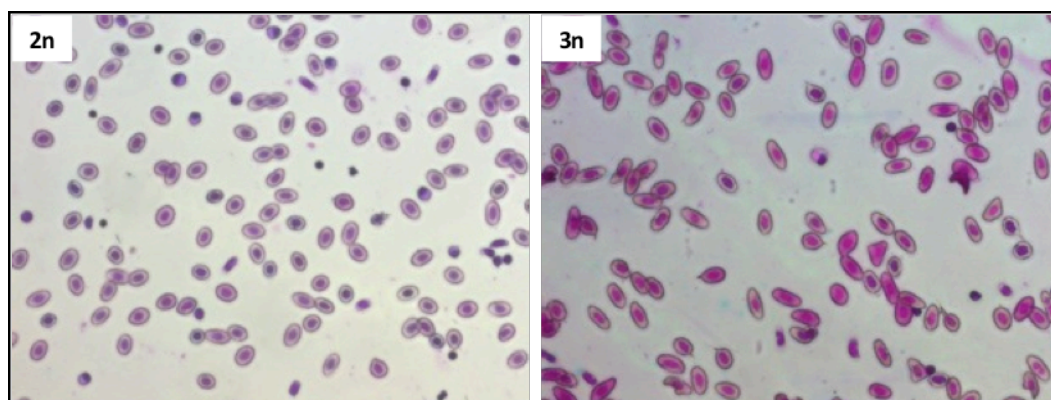


Fig. 3.7.. Tinción de eritrocitos de rodaballo diploide (2n) y triploide (3n) con Hemacolor.

Cuando no se disponía de muestra hematológica para proceder a la verificación del nivel de ploidía, se utilizó la técnica de citometría de flujo anteriormente descrita. Por otro lado, una vez que se diseñó y testó la herramienta molecular descrita en el subcapítulo 4.1., también fue utilizada para comprobar la dosis cromosómica de los peces utilizados en los estudios posteriores.







4. PUBLICACIONES



4. PUBLICACIONES

En este capítulo se presentan los cinco artículos científicos que incluyen los resultados obtenidos durante el transcurso de la tesis doctoral. El primer artículo recoge los resultados derivados del estudio del desarrollo y validación de una nueva herramienta molecular para la detección de la triploidía en rodaballo. En el segundo se presentan los resultados obtenidos en relación al estudio de la susceptibilidad a la apoptosis en leucocitos de rodaballos triploides. En el tercero se muestran los resultados observados en relación a los efectos de la triploidía sobre la morfología externa y las características esqueléticas en rodaballo. En los dos siguientes se muestran los resultados obtenidos en relación al efecto de la triploidía sobre la celularidad muscular, la calidad de la carne y la degradación *post mortem* en rodaballo. El segundo y cuarto artículo se encuentran actualmente en fase de publicación. En cada uno de los artículos de investigación los resultados van acompañados de la metodología científica empleada y de las conclusiones obtenidas.

4.1. VERIFICACIÓN DE LA TRIPLOIDÍA

4.1.1. Desarrollo y validación de una herramienta molecular para la evaluación de la triploidía en rodaballo (*Scophthalmus maximus*).

Hernández-Urcera, J., Vera, M., Magadán, S., Pino-Querido, A., Cal, R. & Martínez, P. (2012). Development and validation of a molecular tool for assessing triploidy in turbot (*Scophthalmus maximus*). *Aquaculture*, 330: 179-184. doi:10.1016/j.aquaculture.2011.11.039.

"

Resumen. La producción de individuos triploides es un objetivo relevante para la industria acuícola debido a los beneficios asociados con su esterilidad y crecimiento. Por lo tanto, han sido desarrollados métodos para la detección de la triploidía basados en las propiedades del genoma, de los cromosomas o de los genes de los individuos triploides. En este estudio se desarrolla un nuevo método, rentable, técnicamente sencillo y preciso para validar la triploidía en rodaballo (*Scophthalmus maximus*) basado en el uso de marcadores moleculares

microsatélite. Se utilizaron cinco familias de rodaballos diploides y triploides que fueron utilizadas para validar esta nueva herramienta molecular. La citometría de flujo, una de las técnicas más precisas y más ampliamente utilizadas para la determinación de la ploidía, fue usada como método de referencia para contrastar los resultados. Para este propósito, fue seleccionado un conjunto de cuatro marcadores moleculares microsatélite altamente polimórficos y distanciados del centrómero. La ploidía fue fácilmente evaluada de acuerdo con el máximo número de alelos presentes en los loci microsatélites testados, mostrando los diploides dos alelos y los triploides tres. Estos microsatélites fueron combinados en una única reacción multiplex, siendo capaces de identificar a los individuos triploides con una precisión de un 100% en todos los cruzamientos analizados.



4.2. APOPTOSIS EN LEUCOCITOS

4.2.1. Efecto de la triploidía en la susceptibilidad a la apoptosis en leucocitos de rodaballo (*Scophthalmus maximus*).

Hernández-Urcera, J., Lluch, N., Cal, R. & Magadán, S. (En revisión).
Effect of triploidy on susceptibility to apoptosis in turbot (*Scophthalmus maximus*)
leucocytes. *Aquaculture Research*, ARE-OA-15-Jul-490.

Resumen. La producción de peces estériles triploides es una opción interesante en la acuicultura ya que previene tanto la maduración precoz de los individuos como la contaminación por posibles escapes de las jaulas de cultivo. Los rodaballos triploides son viables y se desarrollan normalmente, sin embargo, la respuesta celular a diferentes estímulos puede estar afectada, produciendo un comportamiento anormal en sistemas complejos como el sistema inmunitario. En este estudio, leucocitos extraídos del riñón de rodaballos diploides y triploides fueron tratados con diferentes inmunomoduladores para evaluar el efecto de la ploidía sobre la susceptibilidad a la apoptosis de las células inmunitarias. Tras la incubación con Acetato Miristato de Forbol (AMF), Fitohemaglutinina (FHA) y Estaurosporina, la fracción apoptótica de los leucocitos fue detectada mediante una doble tinción con Ioduro de Propidio y Anexina V. Los resultados mostraron un alto porcentaje de apoptosis en los linfocitos triploides incubados con FHA y Estaurosporina comparado con las células diploides, mientras que no hubo efecto tras la incubación con AMF. Estos resultados indican que existe una desregulación a nivel celular que provoca un incremento en la muerte de leucocitos de rodaballos triploides en respuesta a diferentes estímulos, en comparación con los diploides. Estudios futuros son necesarios para elucidar el efecto potencial de esta mayor susceptibilidad a la apoptosis de leucocitos en el desarrollo de una respuesta inmunitaria exitosa en rodaballos triploides durante las infecciones o después de la vacunación.



Effect of triploidy on susceptibility to apoptosis in turbot (*Scophthalmus maximus*) leucocytes

Jorge Hernández Urcera^a, Nuria Lluch^a, Rosa Cal^a, Susana Magadán^{a,b}

^a Instituto Español de Oceanografía, Centro Oceanográfico de Vigo, Planta de Cultivos Marinos, Apartado 1552, 36280 Vigo, Spain

^b Virologie et Immunologie Moléculaires, Institut National de la Recherche Agronomique (INRA), 7852-Jouy-en-Josas, France

Abstract

The production of sterile triploid fish is an interesting option in fish farming, as it prevents both early sexual maturation and the genetic contamination of with wild stocks by potential escapees. Triploid turbot are viable and develop normally; however, the cellular response to different stimuli may be affected, leading to abnormal behaviour of complex systems such as the immune system. In this study head kidney leucocytes from diploid and triploid turbot were treated with different immunomodulators to assess the effect of ploidy on the apoptosis susceptibility of immune cells. After incubation with Phorbol Myristate Acetate (PMA), Phytohemagglutinin (PHA) and Staurosporine, the apoptotic fraction of leucocytes was detected by Annexin V – Propidium Iodide double staining assay. Our data indicate a higher percentage of apoptosis in triploid lymphocytes incubated with PHA and Staurosporine compared to diploid cells, while there was no effect after incubation with PMA. Further studies are needed to elucidate the potential effect on the development of a successful immune response in triploid fishes during infection or after vaccination.

Keywords: Turbot, Triploidy, Immune response, Leucocytes, Apoptosis, Immunomodulators

1. Introduction

Turbot (*Scophthalmus maximus*) is a commercially valuable flatfish species, being one of the most promising marine species of European aquaculture. Production of sterile populations by chromosome set manipulation is a research line of interest for improving

turbot culture, allowing larger sizes of high commercial value (Piferrer et al., 2000). Triploid individuals contain three chromosome sets, and they are generally sterile, thus avoiding the undesirable effects of maturation, and also the genetic impact of escapes of farmed individuals on wild populations (Piferrer et al., 2009; Aloise et al., 2011). In addition, these triploid turbot are mostly females, representing an additional advantage, because females largely outgrow males in this species (Cal et al., 2006). However, some studies indicate that triploid condition may have adverse affects on survival, especially when the environmental conditions are not optimal (Myers and Hershberger, 1991; Blanc et al., 1992; Ojolic et al., 1995).

Although the current literature suggests that triploidy does not affect many aspects of physiology, a high prevalence of deformities and impaired high temperature tolerance in triploids have been described (Benfey, 1999; Fraser et al., 2012). In general, triploid organs are the same size as diploid counterparts but, they are made up of lower number of cells to compensate the effect of increment in cell volume due to a higher chromosome dotation. These changes in the nucleus and cell size may influence intracellular signaling and alter the communication from the cell surface to the nucleus (Ballarin et al., 2004). Additional chromosomes could modify the cellular behavior in response to different stimuli and therefore, *the proper working* of complex systems such as the immune system. Similar respiratory burst activity and phagocytosis per microliter of blood have been described in triploid and diploid turbot neutrophils (Budiño et al., 2006), as well as, there were no differences in complement and neutrophil activities related to ploidy status of rainbow trout (Yamamoto and Iida, 1995). However, there are discrepancies about the resistance of triploid fishes after challenge with different pathogens (Jhingan et al., 2003; Ozerov et al., 2010; Frenzl et al., 2014) and, recent works performed in Chinook and coho salmon indicate differences in the expression of immune related genes between triploid and diploid fish during *Vibrio anguillarum* challenge or under *Piscirickettsia salmonis* infection, respectively (Ching et al., 2010; Correa et al., 2014). Based on these results, the immune response requires further studies to clarify if the triploidy status could compromise the immune function in these fishes.

The development of the immune system and the elaboration of an effective immune response are processes in which a perfect balance between the proliferation and death cell is essential. Cell death, in particular apoptosis, plays a key role as an immune regulatory mechanism (Rathmell and Thompson, 2002). It is involved in the establishment of immune

repertoires via negative selection of autoreactive clones (Sebzda et al., 1999; Melchers et al., 2000), peripheral tolerance (Mueller, 2010), development of innate and adaptive immune response (Donjerkovic and Scott, 2000; Murali and Mehrotra, 2011), and establishment of immunological memory (Vickstrom and Tarlinton, 2010).

Fish express effectors components equivalent to the mammalian apoptotic machinery and it seems that mechanisms which carry out the apoptosis are well conserved across species and evolution (Krumshabel and Podrabsky, 2009). In teleosts has been demonstrated its importance in maintaining immunological homeostasis (Weyts et al., 1997; Hoole et al., 2003), therefore factors that modulate apoptosis have the potential to disrupt and/or to compromise the immune system development and responsiveness. Moreover, many intracellular and extracellular pathogens modulate the apoptosis to escape the immune response or to spread within the host organism (Sitjá-Bobadilla, 2008; Grayfer et al., 2014).

In triploid turbot has been described an increase of apoptosis during the gonadal development compared with their diploid full-sibs (Cal et al., 2010). In diploid males, apoptosis was observed only at the start of spermatogenesis and during testicular regression. In contrast, triploid males had an overall higher rate of apoptotic cells which was constant throughout the reproductive cycle. In diploid females, few or no apoptotic cells were observed in contrast to triploid females where these numbers were markedly increased followed by an overall downward trend as oogenesis progressed. Therefore, Cal et al. (2010) suggested that apoptosis plays a role in the control of germ cell number and fate and this regulatory mechanism is magnified in triploid females. However, any work to evaluate the apoptosis in triploid turbot immune cells has been performed. The aim of this study was to compare the susceptibility to activation-induced apoptosis in diploid and triploid leucocytes through the Annexin V and the fluorescent vital dye, Propidium Iodide (PI), double staining Flow Cytometric assay. A commonly used approach for studying apoptotic cells based on the ability of annexin V to bind phosphatidylserine (Vermes et al., 2000). This lipid is present in the inner face of plasmatic membrane, but externalized early during apoptosis. In later stages of apoptosis, as well as in necrosis, the membrane integrity is lost, which can be measured with a vital dye such as PI. Hence, the staining with annexin V-FITC and PI allows us to resolve viable (annexin-V-/PI-), apoptotic (annexin-V+/PI-) and late apoptotic/necrotic (annexin-V+/PI+) cell subpopulations by Flow Cytometry. The data show that triploid

lymphocytes are more susceptible to suffer apoptosis after incubation with PHA or Staurosporine.

2. Material and methods

2.1. Fishes and triploidy verification

Fish used in this experiment were reared at the facilities of the Spanish Institute of Oceanography in Vigo (NW Spain). A batch of eggs from a single spawning was fertilized with a pool of sperm from two males. Fertilized eggs were divided into two groups, in one group triploidy was induced after fertilization by cold shock according to the protocol of Piferrer et al. (2000). The other group was not treated and was used as diploid control. The ploidy level was confirmed by flow cytometry before eclosion, obtaining more than 95% of triploidy, and in head kidney cells before leucocytes isolation by density gradient described below. This protocol is based in the previously published by Darzynkiewicz et al. (1997), quantifying the DNA level with propidium iodide. The fluorescence was measured using a flow cytometer (FC500MPL, Coulter FACS). To assess the triploidy, we determined the mean fluorescence intensity (GMean) and calculated the ratio sample-GMean to 2n-GMean. We considered triploid if the ratio is approximately 1,5.

2.2. Head kidney leucocytes isolation and *in vitro* cultures

Eight diploid and triploid fishes (8-10 months old) were euthanized with an overdose of the anaesthetic MS-222 (500mg/L, Sigma-Aldrich, Madrid Spain). HK were isolated under sterile conditions and a cellular suspension was obtained by passing the HK through a 100 μ m nylon mesh with Leibovitz's L-15 medium (Gibco, Paisley, Scotland, UK) containing 5% (v/v) of heat-inactivated fetal calf serum (FCS) (PAA, Linz, Austria), penicillin (100 U ml⁻¹) and streptomycin (100 mg ml⁻¹) (Gibco). Turbot HK leucocytes were obtained by density-gradient centrifugation (500g, 20 min) over Ficoll-Paque solution (Amersham Pharmacia Biotech AB, Uppsala, Sweden). The interphase was collected, washed and resuspended in medium. The cells were counted at least four times using a Neubauer chamber and their viability was determined quickly by trypan blue exclusion test (1% in PBS, v/v) (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA). Finally, aliquots of 10⁶ of HK leucocytes were cultured in wells of a flat-bottomed 24-well microtitre plate (Nunc) and incubated in presence of PHA

(1 μ g/mL), PMA (1 μ g/mL), or the apoptosis inducer Staurosporine (0,125 and 0,06 μ g/mL) during 24h.

2.3. Apoptosis Detection by Flow Cytometry

After incubation, cells were washed twice by centrifugation (400 g, 5 min, 4 °C) and the level of apoptosis was evaluated using a double staining flow cytometric assay combining Annexin V-FITC and Propidium Iodide (PI) and according to the manufacturer's protocol (R&D systems kit). Briefly, the washed cells were resuspended in the buffer supplied by the kit containing Annexin V-FITC and PI, incubated during 15 min at room temperature and protected from the light. After that, cells were analyzed by flow cytometry (FC500MPL, Coulter FACS). Flow cytometry results were expressed as percentages of viable (annexin-V-/PI-), early apoptotic (annexin-V+/PI-) and necrotic (or late apoptotic) (annexin-V+/PI+) leucocytes.

2.4. Statistical Analysis

Results were expressed as means \pm SEM. Statistical analyses were made using the SPSS 10.1 software (SPSS, Chicago). Distribution comparisons between samples pairs were made with the Student's t-test (Sokal and Rohlf, 1981). Differences were considered statistically significant when $P < 0.05$.

3. Results and discussion

The ploidy of head kidney cells was assessed by determining the DNA content by flow cytometry before undergoing the leucocytes isolation by density-gradient centrifugation. Examples of histograms from diploid and triploid samples are shown in Figure 1A. The analysis of these cell cycle histograms indicates that the DNA content in triploid cells is higher than diploid cells. In all triploid cases, the ratio sample-GMean to 2n-GMean was approximately 1,5, using the mean fluorescence intensity (GMean) of the G0/G1 peak as reference. It is worthy to note the presence of sub-G0/G1 peak in all triploid samples that could correspond to apoptotic cells whose nuclear fragments have been released after treatment with propidium iodide plus Triton X-100 (Kajstura et al., 2007). To confirm this hypothesis we evaluated apoptosis in head kidney leucocytes isolated from five diploid and five triploid turbot. We carried out a double staining flow cytometric assay using AnnexinV-

FITC and PI to detect the external exposition of phosphatidylserine in apoptotic cells. Moreover, the use of Flow cytometry allowed us to determine if there was a different effect on the two main cellular populations of this organ, lymphoid and myeloid cells, which were selected based on their size (Forward scatter) and complexity (Side scatter). The results did not indicate a significantly higher percentage of apoptosis (Anexin V+/PI-) in triploid lymphocytes ($7 \pm 2,9$) and triploid myeloid cells ($2,5 \pm 1,1$) compared with diploid lymphocytes ($5,4 \pm 1,8$) and diploid myeloid cells ($3 \pm 1,7$), as shown with an example in Figure 1B. The percentage of necrotic or late apoptotic cells (Annexin-V+ / PI+) remained very low and no significant differences were observed (data not shown). These results suggest that the sub-G0/G1 peak observed in triploid samples may correspond to the micronuclei mainly detected in triploid erythrocytes, as described in other species (Strunjak et al., 2003; Johari et al., 2008).

To determine if the ploidy can affect the apoptosis susceptibility of leucocytes after exposition to

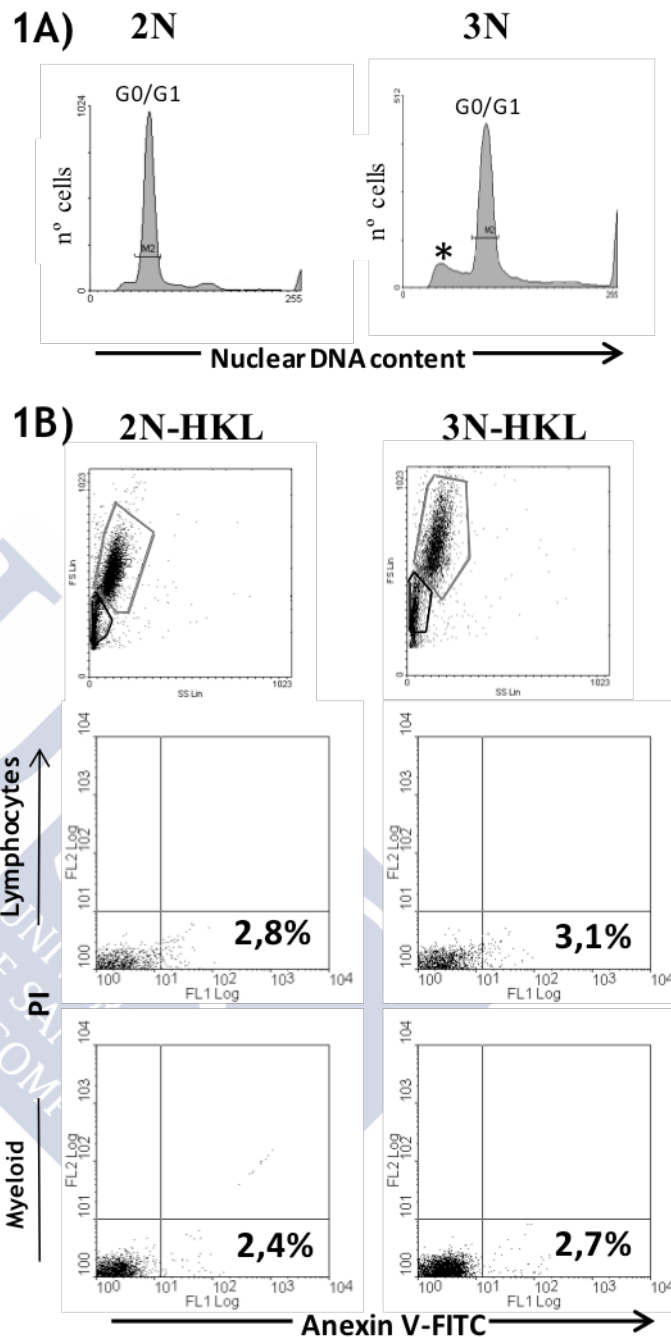


Fig. 1. Evaluation of ploidy and apoptosis in turbot head kidney cells. A) Representative result of the flow cytometric cell cycle analysis of diploid (2N) and triploid (3N) turbot head kidney cells after staining with propidium iodide (PI). The assessment of ploidy was based on the mean fluorescence intensity (GMean) of G0/G1 peak. Note the subG0/G1 peak (indicated with *) in 3N sample. B) Apoptotic cells of lymphocyte and phagocyte subpopulations were identified by double-staining with PI and FITC-labeled Annexin V and quantitated by flow cytometric analysis. Lymphoid and myeloid subsets were selected by different size (Forward Scatter, FS) and complexity (Side Scatter, SS). Note the higher FS value in 3N leucocytes compared to 2N counterparts.

immunomodulators, we also performed the Annexin V/PI double staining on turbot head kidney leucocytes treated with PMA, PHA or the apoptosis promoter Staurosporine. As shown in Table 1, after 24 hours in normal conditions of culture (without immunomodulators), head kidney lymphocytes and myeloid cells presented different viabilities, being the percentage of Annexin-V⁺ / PI – cells higher in lymphocytic region than in myeloid gate, regardless of their ploidy.

The effect of adding leucocyte activators as PHA and PMA was different. With the mitogen PMA we did not observe a significant modulation of apoptosis on diploid or triploid head kidney cells, compared to their respective controls (Table 1). In contrast, the addition of PHA produced an increase of apoptosis in all leucocytes; but only for triploid lymphocytes, the percentage of Annexin-V⁺ was (21,50±4,90) significantly higher than in those cells cultured in medium (14,75±4,17) (Table 1). These data are consistent with the different mechanisms these immunostimulants use to activate cells (Truneh et al., 1985; Licastro et al., 1993): PMA directly activates protein kinase C pathway, while PHA cross-links the T cell receptor to activate T cell proliferation; suggesting a dysregulation of signal transduction pathways after activation of triploid T lymphocytes that leads to the death cell.

Table 1. Apoptosis of head-kidney leucocytes from diploid (2N) and triploid (3N) turbot expose to different immunomodulators.^a Results are expressed as percentages (mean ± S.D.) of annexin-V⁺/PI⁺ lymphocytes or phagocytes after 24 h of incubation in the presence of Phytohemagglutinin (PHA, 1ug/mL), Phorbol Myristate Acetate (PMA, 1ug/mL) or Staurosporine (ST1 at 0,125ug/mL and ST2, at 0,062 ug/mL). Data represent eight independent experiments. * denotes a significant difference between treated and no treated cells (control) at the respective cell population ($p < 0.05$).

Treatment	2N		3N	
	Lymphocytes	Myeloid	Lymphocytes	Myeloid
Control	11,38±4,87	3,13±0,99	14,75±4,17	3,88±2,17
PHA	13,50±4,44	4,50±2,07	21,50±4,90*	6,38±3,93
PMA	11,00±4,38	3,38±1,06	14,50±5,01	4,13±1,81
ST1	17,13±5,38	39,00±22,19*	26,50±6,97*	50,38±20,92*
ST2	13,88±3,64	32,25±22,20*	22,38±7,03*	37,13±24,75*

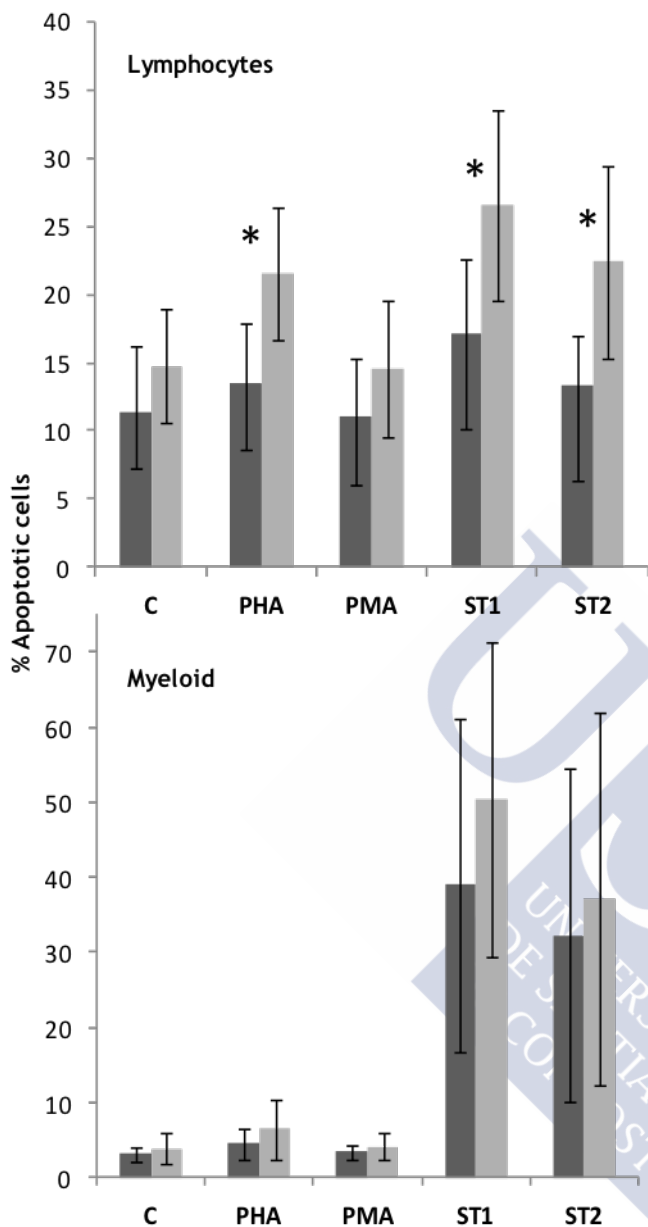


Fig. 2. Percentage of apoptosis in diploid (2N) and triploid (3N) lymphoid and myeloid cell populations observed after 24h incubation with different immunomodulators. Results are expressed as percentages (mean \pm S.D.) of annexin-V+ lymphocytes or phagocytes from 2N (■) and 3N (▒) turbot head-kidney in the presence of PHA (1 μ g/mL), PMA (1 μ g/mL) or Staurosporine (ST1 0,125 and ST2 0,062 μ g/mL). Non treated cells were used as control (C). Data represent eight independent experiments. (*) denotes a significant difference between 2N and 3N cells at respective treatment ($p < 0.05$).

Regarding staurosporine, our results indicate that turbot head kidney lymphocytes are more resistant than myeloid cells. As shown in Table 1, in diploid turbot, we only observed a significant increase in the percentage of Annexin-V+ cells in myeloid gate, from $3,13 \pm 0,99$ to $39,00 \pm 2,19$ or $32,25 \pm 22,20$, after treatment with 0,125 or 0,06 μ g/mL of staurosporine, respectively. Moreover, similar results could be observed in triploid leucocytes, with a higher percentage of apoptotic cells in myeloid cells though, in this case, the triploid lymphocytes cultured in presence of staurosporine also shown a significant higher apoptotic level than control lymphocytes at 0,125 μ g/mL of staurosporine (Table 1). As previously indicated in non treated leucocytes, the percentage of necrotic or late apoptotic cells (Annexin-V+ / PI+) remained low and no significant differences were observed (data non shown). It is worthy to note the effect of staurosporine appears to be different from what has been previously described on sea bream primary head kidney lymphocytes, which were found to be

more sensitive to staurosporine than myeloid cells (Salinas et al., 2007). Overall, these observations may suggest that the effect of staurosporine might have a variable impact on

different species. The recent publication of complete genome sequence of teleost species has revealed the presence of many pairs of duplicated genes, lineage-specific events of genome duplication or contraction and, expansion the gene families that have provided a high rate of functional diversification in proteins (Kassahn et al., 2009), which may contribute to get different responses against the same agent across teleost fish species.

The results suggest a higher susceptibility to apoptosis of triploid leucocytes, in response to different stimuli, compared to diploid counterparts. As shown in Figure 2, the level of apoptosis was significantly higher in triploid than diploid lymphocytes when those were cultured with PHA and with different concentrations of Staurosporine. However, the behavior of the myeloid cells was different, although the percentage of Annexin-V+ triploid myeloid cells cultured in presence of PHA or Staurosporine is higher than in diploid counterparts, the value was not statistically significant (see Figure 2).

These results indicate that not only cell types can be differentially affected in response to different stimuli, due to the diversity in the expression of receptors or mediators, but also the haplotype number may alter the regulatory mechanisms, compromising signal transduction pathways and, as shown in our work, triggering the cell death. As suggested by other authors (Ching et al., 2010; Correa et al., 2014), although triploid fishes maintain homeostasis on a whole animal level, the ploidy level may affect gene expression under stress conditions. Ching et al. (2010) found significant differences in gene expression of immunoglobulin M, MHC-II and β -actin, between diploid and triploid Chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*) challenged with live *Vibrio anguillarum*. While Correa et al. (2014) observed differences in IL-10, natural killer cell enhancement factor and protein C reactive gene expression, between diploid and triploid coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*) experimentally challenged with *Piscirickettsia salmonis*. Moreover, this difference was more marked in those dead triploid fishes. There are no studies on the effect of triploidy on the expression of genes that regulate the programmed cell death in teleost immune cells under diverse conditions however, our results suggest that ploidy affects to the expression of these genes.

The modulation of apoptosis has a direct impact in pathogenesis and disease resistance. There are intracellular pathogens that inhibit the host cell death to facilitate their replication and proliferation and, some virus and bacteria have developed mechanisms to induce host leucocytes death, allowing them to evade the immune response and to replicate

within the host (Sepulcre et al., 2010). On the other hand, the apoptosis is involved in the regulation of the immune response and the resolution of infection process. For example, during inflammatory responses, reactive oxygen and nitrogen intermediates produced at low doses promote the proliferation and survival of leucocytes. However, high levels of these intermediates induce apoptosis by DNA damage, mitochondrial way and direct caspase activation (Trachootham et al., 2008). Thus, the induction of apoptosis must be exquisitely controlled to develop a successful immune response. The results presented here clearly indicate that at the cellular level there is a deregulation that can lead to an increment in triploid turbot immune cell death in response to different stimuli, compared to diploid counterparts. If this observation may cause an incomplete clearance of the pathogens and prolonged infections has to be confirmed with new studies.

In conclusion, these altered responses observed in triploid fishes suggest that ploidy may affect to the immune response under different conditions, like infections and vaccinations. However, further studies are needed to elucidate mechanisms underlying chromosome dosage effects and their impact on performance of survival and immune response in triploid fishes.

Acknowledgements

This work was partially supported by project TEBAMOL from Centro Oceanográfico de Vigo, Instituto Español de Oceanografía (IEO). J. Hernández-Urcera was supported by a FPI predoctoral grant from the IEO and S. Magadán by an Isidro Parga Pondal grant from the General Direction of Research, Development and Innovation of Xunta de Galicia (Spain). We acknowledge Francisco Gambón-Deza (Unidad de Inmunología, Hospital do Meixoeiro, Pontevedra, Spain) for the use of the flow cytometer equipment and Pierre Boudinot (INRA, France) for reading this manuscript and giving his valuable comments.

References

Aloise D.D., Maia-Lima F.D., De Oliveira R.M., Cabral T.D., Molina W.F., 2011. Ploidy manipulation and polyploid detection in the white shrimp *Litopenaeus vannamei* (Boone 1931) (Decapoda, Penaeidae). Mar. Biotech. 13, 41–47.

- Ballarin L., Dall'Oro M., Bertotto D., Libertini A., Francescon A., Barbaro A., 2004. Hematological parameters in *Umbrina cirrosa* (Teleostei, Sciaenidae): A comparison between diploid and triploid specimens. *Comp. Biochem. Physiol.* 138, 45–51.
- Benfey T.J., 1999. The physiology and behaviour of triploid fishes. *Rev. Fish. Sci.* 7, 39–67.
- Blanc J.M., Poisson H., Vallée F., 1992. Survival, growth and sexual maturation of the triploid hybrid between rainbow trout and Arctic char. *Aquat. Living. Resour.* 5, 15–21.
- Budiño B., Cal R.M., Piazzon M.C., Lamas J., 2006. The activity of several components of the innate immune system in diploid and triploid turbot. *Comp. Biochem. Physiol.* 145, 108–113.
- Cal R.M., Terrones J., Vidal S., Martínez P., Piferrer F., 2010. Differential incidence of gonadal apoptosis in triploid-induced male and female turbot (*Scophthalmus maximus*). *Aquaculture* 307, 193–200.
- Cal R.M., Vidal S., Gomez C., Alvarez-Blazquez B., Martinez P., Piferrer F., 2006. Growth and gonadal development in diploid and triploid turbot (*Scophthalmus maximus*). *Aquaculture* 251, 99–108.
- Ching B., Jamieson S., Heath J.W., Heath D.D., Hubberstey A., 2010. Transcriptional differences between triploid and diploid Chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*) during live *Vibrio anguillarum* challenge. *Heredity* 104, 224–234.
- Correa K., Filp M., Cisterna D., Cabrejos M.E., Gallardo-Escárate C., Yáñez, J.M., 2014. Effect of triploidy in the expression of immune-related genes in coho salmon *Oncorhynchus kisutch* (Walbaum) infected with *Piscirickettsia salmonis*. *Aquac. Res.* doi:10.1111/are.12584.
- Darzynkiewicz Z., Juan G., Xun L., Gorezyca W., Murakami T., Traganos F., 1997. Cytometry in cell necrobiology: Analysis of apoptosis and accidental cell death (necrosis). *Cytometry* 27, 1–20.
- Donjerković D., Scott D.W., 2000. Activation-induced cell death in B lymphocytes. *Cell. Res.* 10, 179–192.
- Fraser T.W.K., Fjellidal P.G., Hansen T., 2012. Mayer I. Welfare considerations of triploid fish. *Rev. Fish Sci.* 20, 192–211.
- Frenzl B., Migaud H., Fjellidal P.G., Shinn A.P., Taylor J.F., Richards R.H., Glover K.A., Cockerill D., Bron J.E., 2014. Triploid and diploid Atlantic salmon show similar

- susceptibility to infection with salmon lice *Lepeophtheirus salmonis*. *Pest. Manag. Sci.* 70, 982–988.
- Grayfer L., Hodgkinson J.W., Belosevic M., 2014. Antimicrobial responses of teleost phagocytes and innate immune evasion strategies of intracellular bacteria. *Dev. Comp. Immunol.* 43, 223–242.
- Hoole D., Lewis J.W., Schuwerack P.M., Chakravarthy C., Shrive A.K., Greenhough T.J., Cartwright J.R., 2003. Inflammatory interactions in fish exposed to pollutants and parasites: a role for apoptosis and C reactive protein. *Parasitology* 126, 71–85.
- Jhingan E., Devlin R.H., Iwama G.K., 2003. Disease resistance, stress response and effects of triploidy in growth hormone transgenic coho salmon. *J. Fish Biol.* 63, 806–823.
- Johari S.A., Kalbassi M.R., Sourinezhad I., Wlasow, T., 2008. Observation of red blood cell alterations in triploid rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Acta Sci. Pol. Piscaria* 7, 49–52.
- Kajstura M., Halicka H.D., Pryjma J., Darzynkiewicz Z., 2007. Discontinuous fragmentation of nuclear DNA during apoptosis revealed by discrete "sub-G1" peaks on DNA content histograms. *Cytometry* 71, 125–131.
- Kassahn K.S., Dang V.T., Wilkins S.J., Perkins A.C., Ragan M.A., 2009. Evolution of gene function and regulatory control after whole-genome duplication: comparative analyses in vertebrates. *Genome Res.* 19, 1404–1418.
- Krumschnabel, G., Podrabsky J., 2009. Fish as model systems for the study of vertebrate apoptosis. *Apoptosis* 14, 1–21.
- Licastro F, Davis L.J., Morini M.C., 1993. Lectins and superantigens: membrane interactions of these compounds with T lymphocytes affect immune responses. *Int. J. Biochem.* 25, 845–852.
- Melchers F., ten Boekel E., Seidl T., Kong X.C., Yamagami T., Onishi K., Shimizu T., Rolink A.G., Andersson J., 2000. Repertoire selection by pre-B-cell receptors and B-cell receptors, and genetic control of B-cell development from immature to mature B cells. *Immunol. Rev.* 175, 33–46.
- Murali A.K., Mehrotra S., 2011. Apoptosis – an Ubiquitous T cell Immunomodulator. *J. Clin. Cell. Immunol* 10, S3:2.

- Myers J.M., Hershberger W.K., 1991. Early growth and survival of heat-shocked and tetraploid-derived triploid rainbow-trout (*Oncorhynchus-mykiss*). *Aquaculture* 96, 97–107.
- Mueller D.L., 2010. Mechanisms maintaining peripheral tolerance. *Nat. Immunol.* 11, 21–27.
- Ojolic E.J., Cusack R., Benfey T.J., Kerr S.R., 1995. Survival and growth of all-female diploid and triploid rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) reared at chronic high temperature. *Aquaculture* 131, 177–187.
- Ozerov M.Y., Lumme J., Pääk P., Rintamäki P., Zietara M.S., Barskaya Y., Lebedeva D., Saadre E., Gross R., Primmer C.R., Vasemägi A., 2010. High Gyrodactylus salaris infection rate in triploid Atlantic salmon *Salmo salar*. *Dis. Aquat. Organ.* 91, 129–136.
- Piferrer F., Cal R.M., Alvarez-Blázquez B., Sánchez L., Martínez P., 2000. Induction of triploidy in the turbot (*Scophthalmus maximus*), I: ploidy determination and the effects of cold shocks. *Aquaculture* 188, 79–90.
- Piferrer F., Beaumont A., Falguière J.C., Flajshans M., Haffray P., Colombo L., 2009. Polyploid fish and shellfish: Production, biology and applications to aquaculture for performance improvement and genetic containment. *Aquaculture* 293, 125–156.
- Rathmell J.C., Thompson C.B., 2002. Pathways of apoptosis in lymphocyte development, homeostasis, and disease. *Cell* 109, 97–107.
- Salinas I., Rodríguez A., Meseguer J., Esteban M.A., 2007. Adenosine arrests apoptosis in lymphocytes but not in phagocytes from primary leucocyte cultures of the teleost fish, *Sparus aurata* L. *Dev. Comp. Immunol.* 31, 1233–1241.
- Sebzda E., Mariathasan S., Ohteki T., Jones R., Bachmann M.F., Ohashi P.S., 1999. Selection of the T cell repertoire. *Annu. Rev. Immunol.* 17, 829–874.
- Sepulcre M.P., Muñoz I., Roca F.J., López-Muñoz A., Mulero V., 2010. Molecular strategies used by fish pathogens to interfere with host-programmed cell death. *Dev. Comp. Immunol.* 34, 603–610.
- Sitjà-Bobadilla A., 2008. Living off a fish: A trade-off between parasites and the immune system. *Fish Shellfish Immunol.* 25, 358–372.
- Sokal R.R., Rohlf F.J., 1981. *Biometry: The principles and practices of statistics in biological research*. 2nd ed. New York: Freeman.

- Strunjak-Perovis I., Coz-Rakovac R., Topic Popovic N., 2003. Micronucleus occurrence in diploid and triploid rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum). *Vet. Med. Czech* 48, 215–219.
- Trachootham D., Lu W., Ogasawara M.A., Nilsa R.D., Huang P., 2008. Redox regulation of cell survival. *Antioxid Redox Signal* 10, 1343–1374.
- Truneh A., Albert F., Golstein P., Schmitt-Verhulst A.M., 1985. Early steps of lymphocyte activation bypassed by synergy between calcium ionophores and phorbol ester. *Nature* 313, 318–320.
- Vermes I., Haanen C., Reutelingsperger C., 2000. Flow cytometry of apoptotic cell death. *J. Immunol. Methods* 243, 167–90.
- Vickstrom I., Tarlinton D.M., 2010. B cell memory and the role of apoptosis in its formation. *Mol. Immunol.* 48, 1301–1306.
- Weyts F.A.A., Verburg-van Kemenade B.M.L., Flik G., Lambert, J.G.D, Wendelaar Bonga SE., 1997. Conservation of Apoptosis as an Immune Regulatory Mechanism: Effects of Cortisol and Cortisone on Carp Lymphocytes. *Brain Behav. Immun.* 11, 95–105.
- Yamamoto A., Iida T., 1995. Non-specific defense activities of triploid rainbow trout. *Fish Pathol.* 20, 123–124.



4.3. MALFORMACIONES CORPORALES

4.3.1. La inducción de la triploidía en rodaballo (*Scophthalmus maximus*) no afecta a la morfología general externa del cuerpo ni a las características esqueléticas.

Hernández-Urcera, J., Torres, E., Barreiro, D., Ríos, P., Barreiro-Lois, A., Alonso, J., Cal, R. & Rotllant, J. (2012). Induction of triploidy in turbot (*Scophthalmus maximus*) does not affect gross body morphology and skeleton characteristics. *Aquaculture*, 338: 309-312. doi:10.1016/j.aquaculture.2012.01.023.

Resumen. La producción de peces triploides ha estado a menudo asociada con un incremento de la incidencia de malformaciones morfológicas, incluyendo anomalías en mandíbulas y aletas, proporciones anormales del tronco, deformidades faciales y reducción en el número de vértebras. La naturaleza y frecuencia de aparición de estas malformaciones parece que varía entre especies. En la acuicultura intensiva comercial las malformaciones morfológicas son indeseables ya que reducen la calidad y el valor del producto final. Además, estas anomalías están relacionadas con el bienestar de los animales. Este trabajo muestra los resultados obtenidos en el estudio de la comparación de la morfología corporal y de las características esqueléticas entre rodaballos diploides y triploides de dos grupos de edad de 6 y 12 meses. Para ello, fueron analizados un total de ocho parámetros morfométricos y, a partir de estos parámetros, fueron calculados ocho índices de proporción corporal. Además, para comprobar las posibles malformaciones del esqueleto, se realizaron radiografías de los rodaballos utilizando un sistema de mamografía computarizado. A partir de las radiografías, por medio de un analizador de imágenes se evaluó el número de vértebras, el número de radios de las aletas dorsal y caudal, y las desviaciones en la espina vertebral. Los resultados indicaron que no existen diferencias significativas entre las proporciones corporales analizadas entre ambos grupos de ploidía. Por otro lado, tampoco se observaron diferencias significativas entre la incidencia y tipo de anomalías presentes en el esqueleto de rodaballos diploides y triploides.



4.4. TEJIDO MUSCULAR

4.4.1. Efecto de la triploidía en la celularidad muscular y en calidad de la carne de rodaballo (*Scophthalmus maximus*).

Hernández-Urcera, J., Ayala, M.D., Santaella, M., Periago, M.J., López-Albors, O. & Cal, R. (En revisión). Effect of triploidy on muscle cellularity and flesh quality of turbot (*Scophthalmus maximus*). *Aquaculture*, AQUA-D-15-00748.

Resumen. La producción de rodaballos triploides es un objetivo interesante para la industria de la acuicultura debido a los beneficios asociados con su esterilidad y crecimiento. Con el fin de aumentar el conocimiento sobre cómo el nivel de ploidía puede afectar a la calidad final de la carne en esta especie, la celularidad muscular y algunos parámetros de calidad de la carne fueron estudiados en ejemplares diploides y triploides después de su maduración sexual. La celularidad muscular fue evaluada a lo largo del área transversa del músculo blanco de la sección epaxial izquierda de cada pez. Para comprobar la calidad de la carne fueron analizados varios parámetros físico-químicos (humedad, ceniza, proteína, grasa total, ácidos grasos y minerales). Las propiedades mecánicas de la textura (elasticidad, dureza, cohesividad, gomosidad) fueron determinadas mediante un texturómetro. La celularidad muscular fue diferente entre los dos grupos de ploidía, de tal manera que la densidad de fibras musculares fue mayor para los individuos diploides y el diámetro de las fibras fue mayor en los triploides. Ambos grupos de ploidía no mostraron diferencias significativas en humedad, ceniza, proteína y contenido total de grasa. Ninguna de las propiedades de textura analizadas mostró diferencias significativas entre los dos grupos de ploidía. Tanto en diploides como en triploides, la densidad fibrilar mostró una correlación positiva pero no significativa con parámetros de textura como la elasticidad, la cohesividad, la masticabilidad y la adhesividad, mientras que el diámetro fibrilar mostró una relación negativa pero no significativa con esos parámetros. El nivel de ploidía de cada individuo no mostró relación con el contenido de los ácidos grasos analizados, con la excepción del ácido eicosapentanoico (EPA) que fue mayor en el grupo de los triploides. Tampoco se encontraron diferencias significativas entre diploides y triploides en cuanto a su contenido mineral. De acuerdo con estos resultados, el nivel de ploidía en el rodaballo determina variaciones significativas en la celularidad muscular pero no influye en los parámetros de calidad de la carne analizados.



Effect of triploidy on muscle cellularity and flesh quality of turbot (*Scophthalmus maximus*)

Jorge Hernández Urcera ^a, María Dolores Ayala ^b, Marina Santaella ^c, María Jesús Periago ^c, Octavio López-Albors ^b, Rosa Cal ^a

^a Instituto Español de Oceanografía, Centro Oceanográfico de Vigo, Planta de Cultivos Marinos, Apartado 1552, 36280 Vigo, Spain

^b Departamento de Anatomía y Anatomía Patológica Comparadas, Facultad de Veterinaria, Universidad de Murcia, 30100, Spain

^b Departamento de Tecnología de los Alimentos, Nutrición y Bromatología, Facultad de Veterinaria, Universidad de Murcia, 30100, Spain

Abstract

Production of triploid turbot is a relevant goal for the aquaculture industry due to the benefits associated with their sterility and growth. In order to a better understanding of the final quality of the species, muscle cellularity and quality parameters of the flesh were studied on 7 diploid and 7 triploid turbot of 33 months of age (weight 2200 g, length 45 cm). White muscle cellularity was evaluated throughout white cross-sectional area from the epaxial left muscle section of each fish. To ascertain the flesh quality, several physico-chemical parameters (moisture, ash, protein, total fat, fatty acids and minerals) were analyzed, and textural mechanical properties (springiness, hardness, chewiness, cohesiveness, gumminess and adhesiveness) were determined objectively with a texturometer.

Muscle cellularity was different between both groups, such that muscle fibre density was higher for diploid specimens ($P < 0.001$) and muscle fibres diameters were higher for triploids ($P < 0.001$). Both ploidy groups showed no significant differences in moisture, ash, protein and total fat content ($P > 0.05$). All textural properties analyzed showed no significant differences between both ploidy groups ($P > 0.05$). In both ploidy groups muscle fibre density showed a positive but not significant correlation ($P > 0.05$) with textural parameters such as springiness, cohesiveness, chewiness and adhesiveness, whereas muscle fibre diameter showed a negative but no significant correlation ($P > 0.05$). The level of ploidy of the fish did not determine the content of the most fatty acids, with the exception of eicosapentaenoic acid (C20:5 ω 3) which

was higher in the triploid group. No significant differences ($P>0.05$) existed between diploid and triploid turbot in content of all minerals analyzed. According to our results, the ploidy status determines significant variations on muscle cellularity but does not influence in the flesh quality parameters of the turbot.

Keywords: Turbot, Triploidy, Muscle cellularity; Biometric parameters; Texture; Flesh quality; Fatty acids; ω -3; PUFA; MUFA; SAFA

1. Introduction

Differences in performance between diploids and triploids fish vary between species, and growth and quality advantages in triploids are not generally seen before the onset of sexual maturation (Maxime, 2008; Piferrer et al., 2009). The benefits of the triploidy may also extend to reducing the risk of genetic interaction between farmed and wild stocks in the event of accidental introduction (Peruzzi et al., 2007). Turbot, *Scophthalmus maximus* L., is a fast growing species that reaches 1.5–2 kg at an age of 25–29 months under culture conditions. The first sexual maturity takes place at approximately 24 months. Sexual maturity seems to have a negative effect on the nutritional properties and palatability of the final product (Felip et al., 2001; Fasolato et al., 2003). Production of triploid (3N) sterile fish has been proposed in order to improve flesh quality of adult fish (Quin et al., 1998). Moreover, sterility confers a potential additional advantage, as the energy invested in reproduction can be diverted to somatic growth (Utter et al., 1983; Benfey et al., 1989; Ihssen et al., 1990). Muscle growth was studied in both diploid and triploid turbot from 6 to 48 months of age (Cat et al., 2006). It was similar between them during the first year of the life but later on, triploids grew significantly more than diploids. Moreover, adult triploid turbot had 8% better survival than diploids due to the lack of postspawning mortality in triploids (Cal et al., 2006).

Triploid turbot showed no differences in their gross body morphology and skeleton characteristics compared with their diploid full-sibs (Hernández-Urcera et al., 2012a). However, the effects of ploidy on muscle cellularity and flesh quality traits of turbot have received less attention. Triploids differ from diploids in having larger but fewer cells in most tissues and organs (Benfey et al., 1984a; Benfey et al., 1984b; Benfey, 1999, Johnston et al., 1999; Peruzzi et al., 2005; Peruzzi et al., 2013, Campos Vargas et al., 2015).

Muscle tissue is the main edible portion of fish and responsible of their nutritional value. Fish axial muscle is segmentally arranged into myotomes, with two main fibre types grouped into two muscle layers: the superficial (red muscle) and deep (white muscle) layers (Rowlerson et al., 1985; Scapolo et al., 1988; Veggetti et al., 1990). Fish muscle growth commonly occurs by two possible mechanisms: hypertrophy and hyperplasia of muscle fibres. Hypertrophic growth occurs throughout post-embryonic life until muscle fibres reach a functional maximum diameter (Egginton and Johnston, 1982). Hyperplastic growth of muscle fibres refers to the increase in muscle fibre number due to the recruitment of new fibres. The rates of muscle fibre hypertrophy and hyperplasia to reach a given girth vary between species and different strains of the same species (Weatherley et al., 1979) and can be affected by controlled rearing conditions such as diet (Kiessling et al., 1991), exercise training (Johnston and Moon, 1980; Totland et al., 1987), and temperature (Nathanailides et al., 1995; Johnston et al., 1998, 2003; Ayala et al., 2000, 2001; López-Albors et al., 2003). White muscle cellularity is an important determinant of the textural characteristics of the flesh (Fauconneau et al., 1993; Hurling et al., 1996). Several studies have found a relationship between muscle fibre size and the firmness of the flesh (Hatae et al., 1990; Hurling et al., 1996; Periago et al., 2005), which can also influence on the taste and processing characteristics of the flesh (Johnston, 1999).

Flesh quality includes a complex set of attributes including intrinsic factors such as texture, chemical composition, colour and fat content (Fauconneau et al. 1995). Ploidy has been found to influence somatic growth, muscle cellularity and flesh characteristics in salmon, *Salmo salar* L. (Johnston et al., 1999) and rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Werner et al., 2008). Triploid trout had higher body and fillet weight and larger muscle fibres than diploid trout. However, triploid trout fillets exhibited slightly poorer quality. Aussanasuwannakul et al. (2011) studied the effect of sexual maturation on fillet composition and texture of 2N and 3N female rainbow trout. Authors found that 2N group had higher insoluble collagen content and increased fillet firmness in the month of spawning, whereas 3N females showed higher fillet fat and lower firmness than 2N. On the other hand, Segato et al. (2007) found that cooked flesh tenderness was higher among triploids in shi drum (*Umbrina cirrosa* L.) that could be related to different muscle architecture, as has been described in teleosts (Hatae et al., 1990; Hurling et al., 1996; Periago et al., 2005).

In farmed fish, feeding with artificial diets provides a wide range of nutrients and this fact, not only determines fish growth rate but flesh composition, in particular the lipid content, which may be quantitatively and qualitatively modified (Izquierdo et al., 2003). However, flesh protein content is less influenced by external feeding since it is mainly dependent of intrinsic factors such as the fish species, variety and size (Periago et al., 2005). Concerning the organoleptical properties, a high content of fat in farmed fish could lead to a lower texture, but texture is also related to others factors, such muscle fibre size (Johnston et al., 2000a). No previous studies have compared the differences in muscle cellularity between diploid and triploid turbot yet. The comparison of muscle cellularity and its correlation with textural parameters is important in order to find out any relationship between muscle structure, level of ploidy and flesh characteristics.

Marine organisms are considered a good source of essential minerals since they absorb minerals from the diet and surrounding water and deposit them in their skeletal tissues and organs (Martínez et al., 2010). Several studies have indicated that the concentration of minerals in fish is influenced not only by fish species or seasonal factors, but also by biological aspects, such as the fish feed (Alasavar et al., 2002, Aubourg et al., 2007). However, no previous studies focused on the influence of ploidy in the mineral composition of the turbot have been reported.

Consequently, the main objective of this study was to determine the muscle cellularity, textural properties and physico-chemical parameters of diploid and triploid farmed turbot. Such differentiation is considered important if triploid turbot is to be used as an alternative for diploid turbot culture. This study may contribute to understand the nutritional quality of triploid turbot, and the sensorial acceptance by consumers.

2. Material and methods

2.1. Fish samples, rearing conditions and ploidy verification

These specimens were obtained at the Instituto Español de Oceanografía (Centro Oceanográfico de Vigo) in June 2009 from a broodstock adapted to captivity. Triploidy was induced by applying a heat shock shortly after fertilization of eggs (Piferrer et al., 2000, 2003). The percentage of triploidy in embryos was estimated at 48 h after fertilization (120 embryos) by flow cytometry (Lecommandeur et al. 1994), FC500 flow cytometer; Beckman Coulter, CA, USA, obtaining triploidy 97 %. Triploid and diploid larvae were reared in two

1,000-liter tanks at 18 °C. At 2 months of age, triploid and diploid fish were placed into a two 3800-L tanks (100 fish per tank). The tanks were provided with flow-through water (40 L/min), and the fish were reared at ambient temperature conditions (13-21 °C). The fish were fed by automatic feeders providing dry pellets of increasing size (Skretting, burgos, Spain) 7 days a week until they reached 33 months of age. The diet contained the following analytical constituents: 52% crude protein, 18% crude oils and fats, 9% crude ash, 1,7% crude fibre, 1,5% phosphorous, 2,2% calcium and 0,8% sodium. At this stage, 14 turbot (7 diploid and 7 triploid) were killed by an overdose of the anaesthetic MS-222 (500 mg/L, Sigma-Aldrich, Madrid, Spain). The verification of triploidy in each individual was performed using a molecular tool for triploid determination based on a set of highly polymorphic and centromere-distant microsatellites according to the methodology described by Hernández-Urcera et al. (2012b). All fish were confirmed to be of the ploidy level appropriate to their corresponding test group.

2.2. Sample treatment

Fish were washed with tap water then wiped with tissue and subsequently weighted, measured and eviscerated to collect the weight of the kidney, spleen, liver, heart and gonads. All data were used to calculate these biometrical indexes: dressing index $[(\text{weight}/\text{total weight}) \times 100]$; condition index $[(\text{total weight}/\text{total length}^3) \times 100]$; hepatosomatic index $[(\text{weight liver}/\text{total weight}) \times 100]$; gonadosomatic index $[(\text{weight gonad}/\text{total weight}) \times 100]$; kidney index $[(\text{weight kidney}/\text{total weight}) \times$

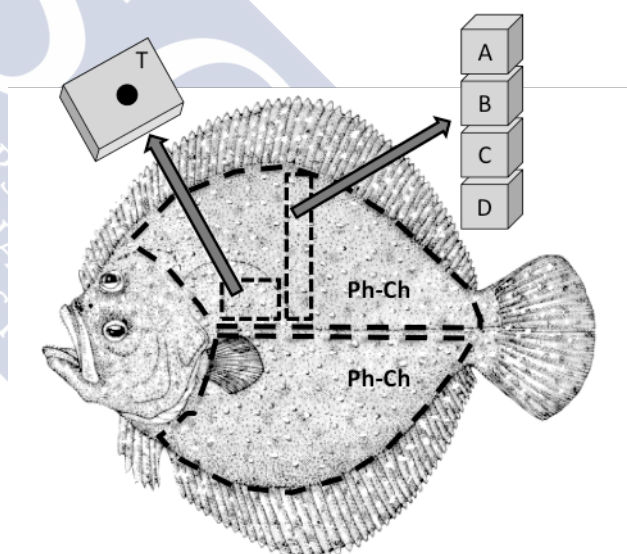


Fig. 1. Turbot muscle sampling. (A, B, C, D) Muscle blocks used to measure the muscle fibre diameter from the epaxial left muscle section of each fish; (T) Muscle block used for textural analysis; (P-Ch) Flesh fillets used for physico-chemical analysis.

100]; spleen index $[(\text{weight spleen}/\text{total weight}) \times 100]$ and heart index $[(\text{weight heart}/\text{total weight}) \times 100]$. Then, the specimens were filleted and muscle samples for muscle cellularity and physico-chemical parameters were obtained as showed in Fig. 1.

2.3. Muscle processing for structural studies

Muscle samples of the triploid and diploid fish were obtained from the half point of the standard length of each specimen. Muscle samples for structural studies with light microscopy were obtained by removal of 5 x 5 x 5 mm samples from the myotome. These blocks were frozen in 2-methylbutane (-80 °C) snap frozen over liquid nitrogen and then stored in a -65 °C freezer. Sections of 8 µm thickness were obtained at -20 °C in a cryostat (Leica CM 1850) and stained with Hematoxylin/Eosin. These sections were photographed by means of an image analysis system device (SigmaScan Pro 5.0) connected to a light photomicroscope (Leitz Dialux, 20). All the muscle cellularity parameters were measured in the white muscle since it comprises the major edible part of the myotome. The whole white muscle cross-sectional area (mm²) and diameters of a minimum of 900 white muscle fibres/fish were measured from the epaxial left muscle section of each fish (Fig. 1). These values were the used to calculate the white muscle fibre density (muscle fibre number/ mm²) for each fish.

2.4. Textural parameters

Textural parameters were measured in the epaxial muscle section of the left side of each fish using a Texturometer mod.1011 (Instron) using a 25-kg load cell, a 5- mm spherical probe and test speed of 1 mm/s. Three measurements were made for each sample perpendicularly to the muscle fibres orientation. The distance, maximum force and maximum shear force values obtained from the texture profile curve of each sample were used to calculate the independent mechanical parameters (springiness, hardness and cohesiveness), and three dependent parameters (chewiness, gumminess and adhesiveness) following the methodology described by Friedman et al. (1962).

2.5. Physico-chemical analysis

Four flesh fillets (epaxial left, hipoaxial left, epaxial right and hipoaxial right) of each diploid and triploid turbot were homogenised separately in an Omni-mixer to obtain a homogeneous sample for the physico-chemical analysis. Fish homogenate was analyzed for moisture, crude protein, total fat and ash content according to AOAC methods (AOAC, 1999). Fatty acids content was determined after the extraction of flesh lipids in accordance with Folch et al. (1957). Lipids were extracted with chloroform-methanol (2:1, v/v) and were obtained by decantation overnight. Lipids were dissolved in hexane and the fatty esters

methylated by 2 N potassium hydroxide in methanol. The separation and quantification of the different fatty acids were made with gas liquid chromatography, using a Agilent Technologies 7890A, (Agilent Technologies Palo Alto, CA, USA) equipped with a flame ionisation detector (FID) operated with a split ratio of 20:1. The column was a DB-23 (60 m, 0.25 mm i.d., 0.25 mm coating thickness (Agilent Technologies). The injector and detector temperatures were held constant at 250 °C and 280 °C, respectively. The oven temperature was programmed at 50 °C for 1 min and ramped at 25 °C/min to 175 °C followed by further ramping at 4 °C/min to 220 °C where the temperature was held constant at 220°C for 18min. . The carrier gas, Helium, was held at a constant pressure of 230 kPa. Chromatographic air and hydrogen (400ml/min and 35 ml/min, respectively) were supplied to the FID. Methyl esters were identified by comparing the retention time of the unknowns with those of known fatty acid methyl ester (FAME) standards (PUFA-1 Marine Source, and Supelco 37 component FAME Mix, both from Supelco, St. Louis, MO, USA). The relative proportion of each fatty acid in the flesh was reported as a percentage of the total FAME present in the injected sample. The sum of the saturated fatty acids (SAFA), the monounsaturated (MUFA), the polyunsaturated (PUFA), the highly unsaturated fatty acids both the n-3 and n-6 series and the ratio between n-3 and n-6 fatty acids were also calculated.

Mineral content was determined from the ashes previously obtained, which were submitted to acid hydrolysis and diluted with milliQ water to a final volume of 50 ml. The quantification of the different minerals was made through atomic emission spectrometry employing inductively couple argon plasma with optical detector (ICP-AES).

2.6. *Statistical analysis*

The statistical analysis was performed with Statistical Package SPSS 15.0. The mean and standard deviation from each group of data were calculated. Data distribution of biometric and muscle cellularity parameters was analyzed by the Shapiro-Wilk test for $P < 0.05$. Data showed a normal distribution ($P > 0.05$). ANOVA was used to analyze the significant differences between both ploidy groups for $P < 0.05$. A Student's t-test was performed to evaluate mean differences for $P < 0.05$ between diploid and triploid turbot on textural and physico-chemical parameters. To measure the relationships between cellularity and textural parameters, a correlation analysis using the Pearson's correlation coefficient was conducted.

3. Results

3.1. Biometric parameters

Table 1 shows biometric parameters in diploid and triploid groups. Body size was similar, the body length ranging between 40 and 52 cm in diploids, and 42 and 48 cm in triploids. The body weight ranging between 1480 and 3280 g in diploids, and 1830 and 2685 g in triploids. Both the dressing index as the gonadosomatic index were higher in the diploid group ($P < 0.05$). Other biometric parameters also showed similar values in both groups, with no significant differences between the diploid and triploids fish ($P > 0.05$).

Table 1. Mean values and standard deviation of biometric and muscle cellularity parameters in diploid and triploid turbot and significance levels between both groups of ploidy

Parameters	Diploid turbot	Triploid turbot	Significance
Body length (cm)	45.07 ± 4.35	45.36 ± 2.37	0.881
Body weight (g)	2,197.86 ± 587.08	2,240.71 ± 286.24	0.865
Cross-sectional area of the white muscle (mm ²)	1,653.31 ± 327.38	1,658.91 ± 304.65	0.974
Muscle fibre density (number of fibres/mm ²)	123.47 ± 23.97	53.78 ± 7.79	<0.001
White muscle fibres diameter (µm)	90.37 ± 29.21	131.85 ± 34.25	<0.001
Number of white muscle fibres	201,077 ± 23,423	90,612 ± 28,873	<0.001
Dressing index	89.88 ± 2.87	92.83 ± 1.07	<0.05
Condition index	2.41 ± 0.34	2.46 ± 0.23	0.451
Hepatosomatic index	3.54 ± 0.86	3.34 ± 1.02	0.712
Gonadosomatic index	3.23 ± 3.16	0.29 ± 0.16	<0.05
Kidney index	0.31 ± 0.09	0.26 ± 0.07	0.328
Spleen index	0.08 ± 0.07	0.08 ± 0.05	0.879
Heart index	0.07 ± 0.01	0.07 ± 0.01	0.391

Dressing index: (weight/total weight) x 100; condition index: (total weight/total length³) x 100; hepatosomatic index: (weight liver/total weight) x 100; gonadosomatic index: (weight gonad/total weight) x 100; kidney index: (weight kidney/total weight) x 100; spleen index: (weight spleen/total weight) x 100; heart index: (weight heart/total weight) x 100.

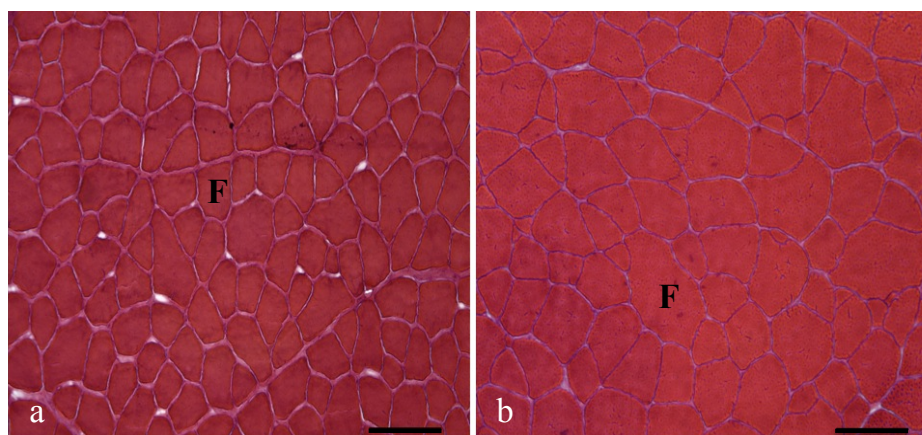


Fig. 2. Transversal muscle sections of diploid (a) and triploid (b) turbot. Bars 100 µm. F white muscle fibres.

3.2. Muscle cellularity

Muscle cellularity was different in diploid and triploid specimens (Table 1 and Fig. 2). Diploid turbot showed a higher muscle fibre density and a higher number of fibres ($P < 0.001$), together with lower value of the average white muscle fibre diameter ($P < 0.001$). Despite of their similar cross-sectional area (Table 1), the muscle fibre density was 43% lower for the triploid group.

3.3. Proximate composition and texture parameters of the flesh

Table 2 shows the physico-chemical and textural parameters of the flesh in diploid and triploid turbot. Both groups showed similar ($P > 0.05$) content of moisture, ash, protein and total fat. None of the textural parameters (springiness, hardness, cohesiveness, chewiness and gumminess) showed significant differences between ploidy groups.

Table 2. Mean values and standard deviation of physico-chemical and textural parameters in flesh of diploid and triploid turbot flesh, and significance levels between both groups of ploidy.

Parameters	Diploid turbot	Triploid turbot	Significance
<i>Physico-chemical</i>			
Moisture (%)	71.19 ± 3.47	70.91 ± 0.98	0.585
Ash (%)	1.02 ± 0.07	0.93 ± 0.15	0.208
Protein (%)	18.22 ± 1.38	18.89 ± 0.82	0.822
Total fat (%)	8.46 ± 3.80	9.17 ± 1.09	0.319
<i>Textural</i>			
Springiness (cm)	4.51 ± 1.18	4.36 ± 0.59	0.765
Hardness (N)	50.43 ± 23.07	49.65 ± 13.78	0.940
Cohesiveness (ratio)	0.43 ± 0.03	0.39 ± 0.09	0.288
Chewiness (N cm)	105.43 ± 62.04	97.68 ± 37.78	0.782
Gumminess (N)	21.59 ± 9.26	21.76 ± 5.99	0.969
Adhesiveness (Ns)	-0.45 ± 0.35	-0.36 ± 0.10	0.535

3.4. Relationship between muscle cellularity and textural parameters

Textural parameters were compared between both groups (diploid and triploid), finding similar values between both groups ($P > 0.05$, not shown). These results indicated that the different muscle cellularity between both populations was not accompanied by differences in the texture. On the other hand, the data of both groups were joined in Table 3 in order to obtain the general relationship between the muscle cellularity and the textural parameters, regardless the ploidy. Muscle fibre density showed a positive but not significant correlation with textural parameters such as springiness, cohesiveness, chewiness and adhesiveness, whereas muscle fibre diameter showed a negative but no significant correlation.

Table 3. Correlation coefficients and significance levels between muscle cellularity and textural parameters of the turbot (diploid and triploid).

	Muscle fibre density (number/mm ²)		Muscle fibre diameter (μ m)	
	Correlation	Significance	Correlation	Significance
Hardness	-0.088	0.764	0.046	0.876
Springiness	0.079	0.789	-0.069	0.816
Cohesiveness	0.431	0.124	-0.465	0.094
Chewiness	0.038	0.898	-0.064	0.829
Gumminess	-0.062	0.833	0.015	0.960
Adhesiveness	0.134	0.663	-0.110	0.721

3.5. Fatty acid composition of the flesh

The fatty acid composition of both turbot groups is shown in Table 4 and Fig. 3. The level of ploidy of the fish did not determine the content of the most fatty acids, with the exception of eicosapentaenoic acid (C20:5 ω 3) which was higher in the triploid group. The most abundant fatty acid in both groups were eicosapentaenoic acid (C20:5 ω 3), palmitic (C16:0), oleic (C18:1 ω 9) and docosahexanoic (C22:6 ω 3). The saturated fatty acids (SAFA), monounsaturated fatty acids (MUFA) and polyunsaturated did not show significant differences between ploidy groups (Table 3). Total ω -3 and total ω -6 fatty acids did not show significant differences between groups ($P > 0.05$). Neither were there any significant differences between diploid and triploid fish as regards ω -3/ ω -6 and PUFA/SAFA ratios.

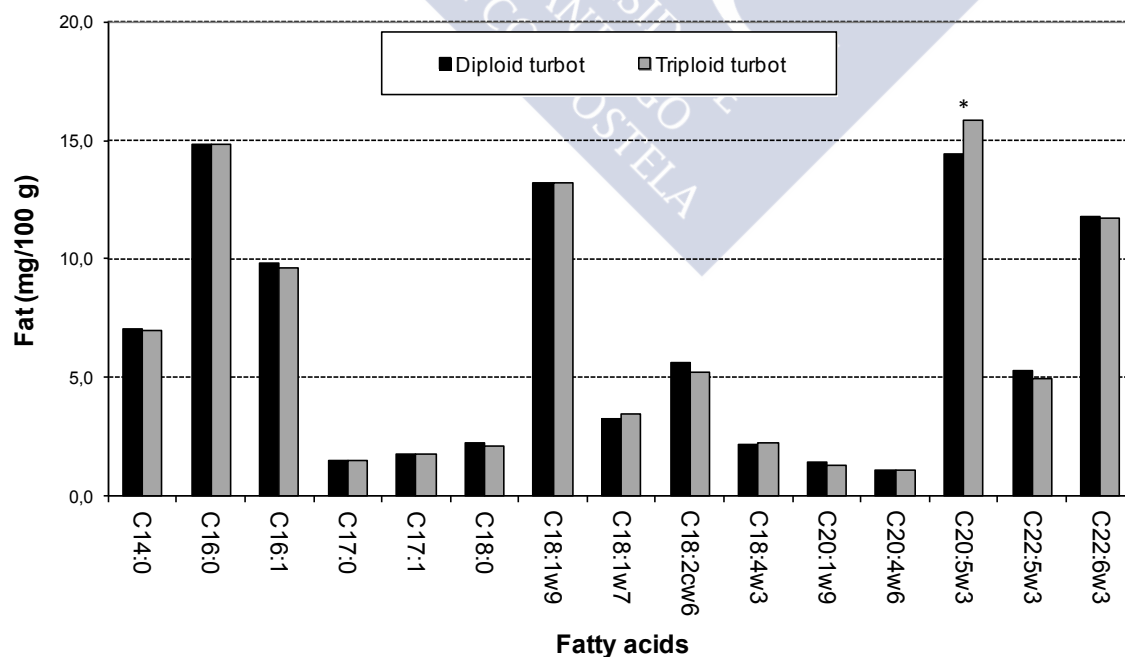


Fig. 3. Fatty acids content in diploid and triploid turbot, expressed as mg/100 g of fat.
* indicates $P < 0.05$

3.6. Mineral composition of the flesh

Table 4 shows the mineral composition of the flesh of diploid and triploid turbot. The minerals present in the flesh of diploid and triploid turbot were classified according to their type. Thus, Ca, K, Mg, Na, P and S (essential macrominerals), Cr, Cu, Fe, Mn and Zn (essential trace minerals) and Al, Bi, Li, Sb, Se and V (non-essential trace minerals). Other 7 minerals were analyzed (Be, B, Co, Mo, Ni, Sr, Ti and Tl) but were not present in any fish of the both ploidy groups. K and P were predominant elements among 25 minerals analysed and constituted 80.1 and 80.3% of the total mineral content in diploid and triploid turbot, respectively. No significant differences ($P>0.05$) existed between diploid and triploid turbot in content of all minerals analyzed. Neither were there any significant differences ($P>0.05$) between both groups of fishes in the total contents of the minerals examined.

Table 4. Mean values and standard deviation of saturated, monounsaturated, polyunsaturated, total ω_6 and total ω_3 fatty acids and mineral contents of diploid and triploid turbot flesh, and significance levels between both groups of ploidy. * The value of these minerals (not showed in the table) was 0: Be (Beryllium), B (Boron), Co (Cobalt), Mo (Molybdenum), Ni (Nickel), Sr (Strontium), Ti (Titanium) and Tl (Thallium).

Parameters	Diploid turbot	Triploid turbot	Significance
<i>Fatty acids</i>			
SAFA (mg/100 g fat)	27.95 ± 0.54	27.49 ± 0.20	0.422
MUFA (mg/100 g fat)	29.73 ± 0.34	29.51 ± 0.31	0.523
PUFA (mg/100 g fat)	42.33 ± 0.66	42.97 ± 0.24	0.661
Total ω_6 (mg/100 g fat)	7.60 ± 0.41	7.32 ± 0.08	0.331
Total ω_3 (mg/100 g fat)	34.73 ± 0.56	35.65 ± 0.28	0.288
Ratio ω_3/ω_6	4.58 ± 0.33	4.87 ± 0.08	0.112
PUFA/SAFA	1.51 ± 0.05	1.56 ± 0.01	0.496
<i>Minerals (mg/100g)</i>			
Al (Aluminium)	1.74 ± 0.15	1.71 ± 0.15	0.091
Bi (Bismuth)	0.54 ± 0.04	0.46 ± 0.01	0.032
Ca (Calcium)	13.50 ± 1.36	12.40 ± 1.04	0.386
Cr (Chromium)	0.06 ± 0	0.05 ± 0.01	0.644
Cu (Copper)	0.08 ± 0.03	0.06 ± 0.01	0.792
Fe (Iron)	0.42 ± 0.05	0.37 ± 0.08	0.599
K (Potassium)	389.40 ± 27.82	390.76 ± 29.69	0.965
Li (Lithium)	1.09 ± 0.78	0.53 ± 0.34	0.107
Mg (Magnesium)	15.57 ± 1.07	16.83 ± 1.13	0.791
Mn (Manganese)	0.17 ± 0.01	0.16 ± 0.01	0.462
Na (Sodium)	76.17 ± 7.73	74.29 ± 5.22	0.883
P (Phosphorus)	148.06 ± 11.12	143.78 ± 9.84	0.663
Sb (Antimony)	0.28 ± 0.02	0.26 ± 0.02	0.742
Se (Selenium)	0.88 ± 0.07	0.82 ± 0.03	0.311
S (Sulfur)	22.42 ± 1.29	21.95 ± 1.93	0.791
V (Vanadium)	0.03 ± 0	0.03 ± 0.01	0.996
Zn (Zinc)	0.97 ± 0.08	0.93 ± 0.03	0.765

4. Discussion

4.1. *Biometric parameters and muscle cellularity*

Triploid somatic cells contains three sets of chromosomes and 50% more DNA than diploid cell nuclei. The nuclear volume is increased in triploids to accommodate this extra genetic material with a corresponding increase in cellular volume (Benfey and Sutterlin, 1984a). The increased cell size found in triploid individuals is not, as a rule manifested in larger tissue size but fewer cells (Bjornevik et al., 2004). In our study gonadosomatic index was higher in the diploid group whereas dressing index was lower for the same group (Table 1). In agreement with our results, Cal et al. (2006) reported a more rudimentary gonadal development in triploid turbot and consequently a lower gonadal size and lower dressing index than diploid turbot of the same age. However, the other biometric indexes (condition index, hepatosomatic index, kidney index, spleen index and heart index) showed similar values in both groups, not being affected by the ploidy status.

Fish muscle cellularity at any given stage of growth is a consequence of the previous balance between muscle fibre hypertrophy and hyperplasia. These are plastic processes, whose balance in growing fish depends on both intrinsic (genotype) (Johnston and McLay, 1997; Johnston et al., 2000b), and extrinsic factors such as temperature (Ayala et al., 2001, Johnston et al., 2000b, 2003, 2011) photoperiod (Johnston et al., 2003; Ayala et al., 2013), diet (Kiessling et al., 1991) and ecological context (Johnston et al., 2000c). In the present work, white muscle cellularity was significantly different in diploid and triploid turbot farmed under the same specific cultivation conditions (diet, temperature, photoperiod, etc) and with similar size (2200 g and 45 cm) (Table 1 and Fig. 1). The white muscle fibre density was significantly lower in triploid than diploid specimens (53.78 and 123.47, respectively), which reflects different muscle cellularity between both populations. Thus, the diploid group showed higher number of fibres (hyperplasia), but smaller size of fibres than the triploid group. These differences show the existence of different patterns of muscle growth between them to reach the same body size. The presented differences of the muscle cellularity agree with previous studies in rainbow trout (Suresh and Sheehan, 1998; Poontawee et al., 2007, Werner et al., 2008,) and in Atlantic salmon (Benfey, 1999; Johnston et al., 1999; Sigurgisladottir et al., 2001; Bjornevik et al., 2004). The present work is the former carried out to compare white muscle cellularity between diploid and triploid turbot.

4.2. Relationship between muscle cellularity and textural parameters

Fish muscle cellularity has important implications for the end-product quality because influence on textural characteristics (Johnston et al., 2000a). It has been suggested that a muscle consisting of smaller fibres should have a higher content of collagen. As each fibre is surrounded by a sheet of collagen, and more collagen thereby should be present in a muscle with many small fibres. Such differences could potentially influence the textural properties of the fillet (Bjornevik et al., 2004). Negative correlation between fibre diameter and the textural parameters of cooked flesh has been observed in different fish species (Hatae et al., 1990; Hurling et al., 1996). Johnston et al. (2000a) reported a positive correlation between fibre density and texture in smoked Atlantic salmon. In the present study muscle fibre density showed a positive but not significant correlation with textural parameters such as springiness, cohesiveness, chewiness and adhesiveness, whereas muscle fibre diameter showed a negative but no significant correlation. Similarly, Bjornevik et al. (2004) found no relationship between fibre area or fibre density with textural parameters working with raw fish of Atlantic salmon. Furthermore, when comparing the textural parameters between both groups (diploid versus triploid specimens), the textural results were similar between both of them. These results indicate that the muscle cellularity was not directly correlated with the texture in these populations that differs of found in other teleosts. This was probably due to the fact that not only muscle cellularity but also other chemical parameters are involved in flesh texture properties (Periago et al., 2005).

4.3. Chemical composition

There are scarce studies in the scientific literature comparing the physico-chemical composition between diploid and triploid fishes and this work is the former conducted with diploid and triploid turbot. Fat is related with moisture, since fat and water account for approximately the 80% on the total composition of the flesh (Huss, 1999) (80 % in our results). Poontawee et al. (2007) analyzed 78-month old diploid and triploid rainbow trout and they reported that the fillets of triploid trout contained more crude fat and less moisture than the diploids. However, no effect of ploidy was found by these authors with regard to the protein and ash content. In our study no significant differences were found in protein, moisture, total fat and ash contents of both groups of ploidy (Table 2). In agreement with our

findings, Hussain et al. (1995) have also reported no significant differences in crude protein, crude lipid and moisture comparing diploid and triploid tilapia (*Oreochromis niloticus*).

Lipid composition of fishes is quite variable since it depends on the dietary lipid sources, the period of the year, water temperature, salinity, photoperiod, spawning etc (Codier et al., 2002). The pattern of fatty acids in both groups did not show significant differences (Table 3; Fig. 3) for the main groups of fatty acids. SAFA and PUFA contents, as well as the PUFA/SAFA ratio also did not show significant differences between diploid and triploid turbot. The fatty acids profiles were very similar to the common values reported for farmed turbot (Martínez et al., 2010), being the palmitic acid (C16:0) the primary SAFA, the oleic acid (C18:1 ω 9) the main MUFA, and eicosapentaenoic (C20:5 ω 3), docosahexanoic (C22:6 ω 3) and linoleic (C18:2 ω 6) acids the most abundant PUFA. Both ploidy groups were a good source of ω -3 fatty acids, particularly eicosapentaenoic acid (C20:5 ω 3) and docosahexanoic acid (C22:6 ω 3).

Eicosapentaenoic acid (EPA) was the only fatty acid that showed significant differences between both groups. This difference may be related to the lack of gonadal maturation in females. The principal biological role of α -linolenic acid (α LNA; 18:3 ω -3) appears to be as a precursor for the synthesis of longer chain ω -3 polyunsaturated fatty acids (PUFA) by conversion through the ω -3 PUFA elongation-desaturation pathway. The fractional conversion of α LNA to the longer chain ω -3 PUFA is greater in female than in male, which may be due to a regulatory effect of estrogen (Burdge and Wootton, 2002). In our study, the turbots were tested after the first sexual maturity. Estrogens have direct action on the production of gonadotropins, and influence the development and maturation of sexual organs. The endocrine systems associated with ovarian development are fully competent in triploid females but lack the appropriate signals for ovarian development to occur, presumably due to the small number of developing follicles (Schafhauser-Smith and Benfey, 2003). We can assume that the female diploid specimens have used estrogens for the maturation of the gonads, while triploids, which not reach sexual maturity, can use them in EPA synthesis from α -LNA and LNA fatty acids are considered essential for vertebrates, and must be present in the diet. Triploid females continued feeding and growth compared to the diploid females who ceased feeding as part of the latter phases of sexual maturation. Triploid males although reproductively sterile are hormonally competent to sexually mature, in contrast to diploids;

even male triploids continue to feed during the latter stages of their sexual maturation (Oppedal et al, 2003).

Concerning total ω -3, total ω -6 fatty acids levels and ω -3/ ω -6 and PUFA/SAFA ratios neither were there any significant differences between diploid and triploid fish.

Minerals have been reported to show significant variations among fish species (Lal, 1995). Several studies have indicated that the concentration of minerals in farmed fishes is influenced by a number of factors such seasonal and biological differences (species, size, age, sex and sexual maturity), food source and cultivation conditions (Alasalvar et al., 2002; Aubourg et al., 2007; Uysal et al., 2008). The main functions of essential minerals include skeletal structure, maintenance of colloidal system and regulation of acid-base equilibrium. Minerals also constitute important components of hormones, enzymes and enzyme activators (Khan et al., 1987; Lal, 1995). Despite this importance, there are not studies in the scientific literature comparing the mineral composition in relation with the ploidy status. In the present study we analyze the levels of 25 minerals in the flesh of diploid and triploid turbot. No significant differences existed between both groups in content of all minerals analyzed. Neither were there any significant differences between both groups of fishes in the total contents of the minerals examined.

5. Conclusions

Muscle cellularity (cellular size and density) was significantly different in diploid and triploid turbot. However, the resulting variation in these parameters did not determine significant differences on textural parameters between both ploidy specimens. In addition, the nutritional composition of the flesh is not influenced by the ploidy status in turbot. These flesh quality results support the possibility of producing sterile triploid turbot in aquaculture. However since cooking procedures can affect structural parameters of flesh and its final acceptance by consumers, further studies should be done to find out the relationship between muscle tissue parameters and organoleptical properties after cooking.

Acknowledgements

This work was made possible thanks to the fruitful collaboration between the Oceanographic Center of Vigo from the Spanish Institute of Oceanography (IEO) and the Faculty of

Veterinary from the University of Murcia. We acknowledge Castora Gómez and the staff of the IEO for their help in handling and taking care of the fish. Jorge Hernández-Urcera was supported by a FPI predoctoral grant from the IEO.

References

- Alasalvar, C., Taylor, K.D.A., Zubcov, E., Shahidi, F., Alexis, M., 2002. Differentiation of cultured and wild sea bass (*Dicentrarchus labrax*), total lipids content, fatty acid and trace mineral composition. *Food Chem.* 79, 145–150.
- AOAC, 1999. *Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists*, 16th ed. The Association of Official Analytical Chemists, Inc., Arlington, VA.
- Aubourg S.P., Losada V., Prego R., 2007. Distribution of lipids and trace minerals in different muscle sites of farmed and wild turbot (*Psetta maxima*). *International Journal of Food Science and Technology* 42, 1456–1464.
- Aussanasuwannakul, A., Kenney, P.B., Weber, G.M., Yao, J., Slider, S.D., Manor, M.L., Salem, M., 2011. Effect of sexual maturation on growth, fillet composition, and texture of female rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) on a high nutritional plane. *Aquaculture* 317, 79–88.
- Ayala, M.D., López-Albors, O., Gil, F., Latorre, R., Vázquez, J.M., García-Alcázar, A., Abellán, E., Ramírez, G., Moreno, F., 2000. Temperature effects on muscle growth of the axial musculature of the sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.). *Anat. Histol. Embryol.* 29, 235–241.
- Ayala, M.D., López-Albors, O., Gil, F., García-Alcázar, A., Abellán, E., Alarcón, J.M., Álvarez, M.C., Ramírez-Zarzosa, G., Moreno, F., 2001. Temperature effects on muscle growth in two populations (Atlantic and Mediterranean) of sea bass, *Dicentrarchus labrax* L. *Aquaculture* 202, 359–370.
- Ayala, M. D., E. Abellán, M. Arizcun, A. García-Alcázar, Navarro, F, A. Blanco, O. López-Albors. 2013. Muscle development and body growth in larvae and early postlarvae of shi drum, *Umbrina cirrosa* L., reared under different larval photoperiod. *Muscle structural and ultrastructural Study. Fish. Physiol. Biochem.* 39, 807–827
- Benfey, T.J., Sutterlin, A.M., 1984a. Triploidy induced by heat shock and hydrostatic pressure in landlocked Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Aquaculture* 36, 359–367.

- Benfey, T.J., Sutterlin, A.M., 1984b. Growth and gonadal development in triploid landlocked Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 41, 1387–1392.
- Benfey T.J., Dye H.M., Solar I.I., Donaldson E.M., 1989. The growth and reproductive endocrinology of adult triploid pacific salmonids. *Fish Physiol. Biochem.* 6, 113–120.
- Benfey, T.J., 1999. The physiology and behavior of triploid fishes. *Rev. Fish. Sci.* 7, 39–67.
- Bjornevik, M., Espe, M., Beattie, C., Nortvedt, R., Kiessling, A., 2004. Temporal variation in muscle fibre area, gaping, texture, colour and collagen in triploid and diploid Atlantic salmon (*Salmo salar*, L.). *J. Sci. Food Agric.* 84, 530–540.
- Burdge, G.C., Wootton, S.A. 2002. Conversion of alpha-linolenic acid to eicosapentaenoic, docosapentaenoic and docosahexaenoic acids in young women. *Br. J. Nutr.* 88, 411–420.
- Cal R., Vidal S., Gómez C., Álvarez-Blázquez B., Martínez P., Piferrer F., 2006. Growth and gonadal development in diploid and triploid turbot (*Scophthalmus maximus*). *Aquaculture* 251, 99–108.
- Campos Vargas, C., Peruzzi, S., Hagen, Ø. 2015. Growth and muscle cellularity of diploid and triploid Atlantic cod (*Gadus morhua* Linnaeus, 1758) larvae. *J. Appl. Ichthyol.* doi: 10.1111/jai.12792.
- Codier, M., Brichon, G., Weber, J.M., Zwingelstein, G., 2002. Changes in the fatty acid composition of phospholipids in tissues of farmed sea bass (*Dicentrarchus labrax*) during an annual cycle. Roles of environmental temperature and salinity. *Comp. Biochem. Physiol., Part B Biochem. Mol. Biol.* 133, 281–288.
- Egginton, S., Johnston, I.A., 1982. Muscle fibre differentiation and vascularisation in the juvenile European eel (*Anguilla Anguilla* L.). *Cell Tissue Res.* 222, 563–577.
- Fasolato L., Bertotto D., Lopparelli R.M., Corato A., Francescon A., Barbaro A., Segato S., 2003. Effect of triploidy on quality traits of large size shi drum (*Umbrina cirrosa* L.). In: Fiere V (ed) *Fish farming in Mediterranean Europe: quality for developing markets*. Book of abstracts. International Aquaculture Conference, Verona, Italy, pp 66.
- Fauconneau, B., Chmaitilly, J., Andre, S., Cardinal, M., Cornet, J., Vallet, J.L., Dumont, J.P., Laroche, M., 1993. Characteristics of rainbow trout flesh: I. Chemical composition and cellularity of muscle and adipose tissues. *Sci. Aliments* 13, 173–187.

- Fauconneau, B., Alami-Durante, H., Laroche, M., Marcel, J., Vallot, D., 1995. Growth and meat quality relations in carp. *Aquaculture* 129, 265–297.
- Felip, A., Piferrer, F., Carrillo, M., Zanuy, S., 2001. Comparative growth performance between diploid and triploid sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) over the first four spawning seasons. *J. Fish Biol.* 58, 76–88.
- Folch, J., Lees, M., Stanley, G.H.S., 1957. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J. Biol. Chem.* 226, 497–509.
- Friedman, H.H., Whitney, J.E., Szczesniak, A.S., 1962. The texturometer—a new instrument for objective texture measurement. *J. Food Sci.* 28, 390–396.
- Hatae, K., Yoshimatsu, F., Matsumoto, J.J., 1990. Role of muscle fibres in contributing firmness of cooked fish. *J. Food Sci.* 55, 693–696.
- Hernández-Urcera, J., Torres, E., Barreiro, D., Barreiro-Lois, A., Alonso, J., Cal, R., Rotllant, J., 2012a. Induction of triploidy in turbot (*Scophthalmus maximus*) does not affect gross body morphology and skeleton characteristics. *Aquaculture* 338, 309–312.
- Hernández-Urcera, J., Vera, M., Magadán, S., Pino-Querido, A., Cal, R.M., Martínez, P., 2012b. Development and validation of a molecular tool for assessing triploidy in turbot (*Scophthalmus maximus*). *Aquaculture* 330, 179–184.
- Hurling, R., Rodell, J.B., Hunt, H.D., 1996. Fibre diameter and fish textural. *J. Texture Stud.* 27, 679–685.
- Huss, H.H., 1999. El pescado fresco: su calidad y cambios de su calidad. Documento Técnico de pesca 348. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación, FAO, Roma, Italia.
- Hussain, M.G., Rao, G.P.S., Humayun, N.M., Randall, C.F., Penman, D.J., Kime, D., Bromage, N.R., Myers, J.M., McAndrew, B.J., 1995. Comparative performance of growth, biochemical composition and endocrine profiles in diploid and triploid tilapia *Oreochromis niloticus* L. *Aquaculture* 138, 87–97.
- Ihssen P.E., McKay L.R., McMillan I., Phillips R.B., 1990. Ploidy manipulation and gynogenesis in fishes: cytogenetic and fisheries applications. *Trans. Am. Fish. Soc.* 119, 698–717.
- Izquierdo, M.S., Obach, A., Arantzamendi, L., Montero, D., Robaina, L., Rosenlund, G., 2003. Dietary lipid sources for sea bream and sea bass: growth performance, tissue composition and flesh quality. *Aquac. Nutr.* 9, 397–407.

- Johnston, I.A., Moon, T.W., 1980. Endurance exercise training in the fast and slow muscles of a teleost fish (*Pollachius virens*). *J. Comp. Physiol.* 135, 147–156.
- Johnston, I.A., McLay, H.A., 1997. Temperature and family effects on muscle cellularity at hatch and first feeding in Atlantic Salmon (*Salmo salar* L.). *Can. J. Zool.* 75, 64–74.
- Johnston, I.A., Cole, N.J., Abercromby, M., Vieira, V.L.A., 1998. Embryonic temperature modulates muscle growth characteristics in larval and juvenile herring (*Clupea harengus*). *J. Exp. Biol.* 201, 623–646.
- Johnston, I.A., 1999. Muscle development and growth: potential implications for flesh quality in fish. *Aquaculture* 177, 99–115.
- Johnston, I.A., Strugnell, G., McCracken, M.L., Johnstone, R., 1999. Muscle growth and development in normal-sex ratio and all-female diploid and triploid Atlantic salmon. *J. Exp. Biol.* 202, 623–646.
- Johnston, I.A., Alderson, R., Sandham, C., Dingwall, A., Mitchell, D., Selkirk, C., Nickell, D., Baker, R., Robertson, B., Whyte, D., Springate, J., 2000a. Muscle fibre density in relation to the colour and textural of smoked Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Aquaculture* 189, 335–349.
- Johnston, I.A., Alderson, D., Sandham, C., Mitchell, D., Selkirk, C., Dingwall, A., Nickell, D.C., Baker, R., Robertson, W., Whyte, D., Springate, J., 2000b. Patterns of muscle growth in early and late maturing populations of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Aquaculture* 189, 307–333.
- Johnston, I.A., Phenotypic plasticity of early myogenesis and satellite cell numbers in Atlantic salmon spawning in upland and lowland tributaries of a river system. 2002c. *J. Exp. Biol.* 203, 2553–2564.
- Johnston, I.A., Manthri, S., Alderson, R., Smart, A., Campbell, P., Nickell, D., Robertson, B., Paxton, Ch.G.M., Burt, M.L., 2003. Freshwater environment affects growth rate and muscle fibre recruitment in seawater stages of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *J. Exp. Biol.* 206, 1337–1351.
- Johnston, I.A., Bower, N.I., Macqueen, D.J., 2011. Growth and the regulation of myotomal muscle mass in teleost fish. *The J. Exp. Biol.* 214, 1617–1628.
- Khan, A.H., Ali, M., Biaswas, S.K., Hadi, D.A., 1987. Trace elements in marine fish from the bay of Bengal. *Sci. Total Environ.* 61, 121–130.

- Kiessling, A., Storebakken, T., Asgard, T., Kiessling, K.H., 1991. Changes in the structure and function of the epaxial muscle of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) in relation to ration and age: I. Growth dynamics. *Aquaculture* 93, 335–356.
- Lal, S.P., 1995. Macro and trace elements in fish and shellfish. In A. Ruiter (Ed.), *Fish and fishery products: composition, nutritive properties and stability* (pp. 187-214). Wallingford: CAB International.
- Lecommandeur, D., Haffray, P., Philippe, L., 1994. Rapid flow cytometry method for ploidy determination in salmonid eggs. *Aquac. Fish. Manage.* 25, 345–350.
- López-Albors, O., Ayala, M.D., Gil, F., García-Alcázar, A., Abellán, E., Latorre, R., Ramírez-Zarzosa, G., Vázquez, J.Ma., 2003. Early temperature effects on muscle growth dynamics and histochemical profile of muscle fibres of sea bass *Dicentrarchus labrax* L., during larval and juvenile stages. *Aquaculture* 220, 385–406.
- Maxime, V., 2008. The physiology of triploid fish: current knowledge and comparisons with diploid fish. *Fish Fish.* 9, 67–78.
- Martínez, C., Miranda, J.M., Nebot, C., Rodríguez, J.L., Cepeda, A., Franco, C.M., 2010. Differentiation of farmed and wild turbot (*Psetta maxima*): proximate chemical composition, fatty acid profile, trace minerals and antimicrobial resistance of contaminant bacteria. *Food. Sci. Technol. Int.* 16, 435–441.
- Nathanailides, C., López-Albors, O., Stickland, N.C., 1995. Influence of pre-hatch temperature on the development of muscle cellularity in post-hatch Atlantic-Salmon (*Salmo salar*, L.). *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 52 (4), 675–680.
- Oppedal, F., Taranger, G.L., Hansen, L. 2003. Growth performance and sexual maturation in diploid and triploid Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) in seawater tanks exposed to continuous light or simulated natural photoperiod. *Aquaculture*, 215, 145–162.
- Periago, M.J., Ayala, M.D., López-Albors, O., Abdel, I., Martínez, O., García-Alcázar, A., Ros, G., Gil, F., 2005. Muscle cellularity and flesh quality of wild and farmed sea bass *Dicentrarchus labrax* L. *Aquaculture* 249, 175–188.
- Peruzzi, S., Varsamos, B., Chatain, B., Fauvel, C., Menu, B., Falguiere, J.C., Severe, A., Flik, G. 2005. Haematological and physiological characteristics of diploid and triploid sea bass, *Dicentrarchus labrax* L. *Aquaculture* 244, 359–367.
- Peruzzi, S., Kettunen, A., Primicerio, R., Kauric, G., 2007. Thermal shock induction of triploidy in Atlantic cod (*Gadus morhua* L.). *Aquac. Res.* 38, 926–932.

- Peruzzi, S., Jobling, M., Falk-Petersen, I.B., Lein, I., Puvanendran, V. 2013. Gut morphology of diploid and triploid Atlantic cod, *Gadus morhua*. *J. Appl. Ichthyol.* 29, 1104–1108.
- Piferrer, F., Cal, R.M., Álvarez-Blázquez, B., Sánchez, L., Martínez, P., 2000. Induction of triploidy in the turbot (*Scophthalmus maximus*). I. Ploidy determination and the effects of cold shocks. *Aquaculture* 188, 79–90.
- Piferrer, F., Cal, R.M., Gómez, C., Bouza, C., Martínez, P., 2003. Induction of triploidy in the turbot (*Scophthalmus maximus*), II. Effects of cold shock timing and induction of triploidy in a large volume of eggs. *Aquaculture* 220, 821–831.
- Piferrer, F., Beaumont, A., Falguière, J.C., Flajshans, M., Haffray, P., Colombo, L., 2009. Polyploid fish and shellfish: production, biology and applications to aquaculture for performance improvement and genetic containment. *Aquaculture* 293, 125–156.
- Poontawee, K., Werner, C., Mueller-Belecke, A., Hoerstgen-Schwark, G., Wicke, M., 2007. Flesh qualities and muscle fiber characteristics in triploid and diploid rainbow trout. *J. Appl. Ichthyol.* 23, 273–275.
- Quin J.G., Fast A.W., Ako H., 1998. Growth performance of diploid and triploid Chinese catfish *Clarias fuscus*. *Aquaculture* 89, 351–364.
- Rowlerson, A., Scapolo, P.A., Mascarello, F., Carpena, E., Veggetti, A., 1985. Comparative study of myosin present in the lateral muscle of some fish: species variations in myosin isoforms and their distribution in red, pink and white muscle. *J. Muscle Res. Cell Motil.* 6, 601–640.
- Scapolo, P.A., Veggetti, A., Mascarello, F., Romanello, M.G., 1988. Developmental transitions of myosin isoforms and organisation of the lateral muscle in the teleost *Dicentrarchus labrax* (L.). *Anat. Embryol.* 178, 287–295.
- Schafhauser-Smith, D., Benfey, T.J. 2003. In vitro steroid production by triploid ovarian follicles. *Gen. Comp. Endocr.* 133, 279–286.
- Segato, S., Fasolato, L., Bertotto, D., Libertini, A., Balzan, S., Corato, A., Novelli, E., 2007. Effect of triploidy on quality traits of shi drum (*Umbrina cirrosa* L.) until the second rearing year. *Aquac. Res.* 38, 59–65.
- Sigurgisladdottir, S., Sigurgisladdottir, M.S., Ingvarsdottir, H., Torrissen, O.J., Hafsteinsson, H., 2001. Microstructure and texture of fresh and smoked Atlantic salmon, *Salmo salar* L., fillets from fish reared and slaughtered under different conditions. *Aquac. Res.* 32, 842–848.

- Suresh, A.V., Sheehan, R.J., 1998. Muscle fiber growth dynamics in diploid and triploid rainbow trout. *J. Fish Biol.* 52, 570–587.
- Totland, G.K., Kryvi, H., Jodestol, K.A., Christiansen, E.N., Tangeras, A., Slinde, E., 1987. Growth and composition of the swimming muscle of adult Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) during long-term sustained swimming. *Aquaculture* 66, 299–313.
- Utter F.M., Johnson O.W., Thorgaard G.H., Rabinovitch P.S., 1983. Measurement and potential applications of induced triploidy in Pacific salmon. *Aquaculture* 35, 125–135.
- Uysal K., Emre Y., Kose E., 2008. The determination of heavy metal accumulation ratios in muscle, skin and gills of some migratory fish species by inductively coupled plasma-optical emission spectrometry (ICP-OES) in Beymelek Lagoon (Antalya/Turkey). *Microchem. J.* 90, 67–70.
- Veggetti, A., Mascarello, F., Scapolo, P.A., Rowlerson, A., 1990. Hyperplastic and hypertrophic growth of lateral muscle in *Dicentrarchus labrax* (L.): an ultrastructural and morphometric study. *Anat. Embryol.* 182, 1–10.
- Weatherley, A.H., Gill, H.S., Rogers, S.C., 1979. Growth dynamics of muscle fibres, dry weight, and condition in relation to somatic growth rate in yearling rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Can. J. Zool.* 57, 2385–2392.
- Werner, C., Poontawee, K., Mueller-Belecke, A., Hoerstgen-Schwark, G., Wicke, M., 2008. Flesh characteristics of pan-size triploid and diploid rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) reared in a commercial fish farm. *Arch. Tierz.-Arch. Anim. Breeding* 51, 71–83.

4.4.2. Degradación *post mortem* del tejido muscular en diploides y triploides de rodaballo (*Scophthalmus maximus*).

Ayala, M.D, Cal, R., **Hernández-Urcera, J.**, Blanco, A. & López-Albors, O. (2013). Post-mortem degradation of the muscle tissue in diploid and triploid turbot (*Scophthalmus maximus*). *Aquaculture International*, 21: 1077-1090. doi:10.1007/s10499-012-9614-5.

"

Resumen. En la calidad de la carne influyen una serie de atributos complejos, incluyendo factores intrínsecos como la textura, la composición bioquímica, el color y el contenido en grasa. Además, la calidad es frecuentemente afectada por factores extrínsecos como el manejo y el almacenamiento. Las fases *post mortem* implican procesos químicos, físicos y bioquímicos seguidos de deterioro microbiológico, lo que reduce la frescura, modifica la estructura muscular y altera la calidad de la carne. Los cambios *post mortem* en la ultraestructura muscular de rodaballo no habían sido estudiados hasta el momento, así como los efectos de la ploidía en la degradación *post mortem*. En este trabajo fueron estudiados los cambios musculares estructurales y ultraestructurales a lo largo de la degradación *post mortem* en rodaballos diploides y triploides de 22 meses de edad. Los cambios en la textura a lo largo del proceso de degradación también fueron estudiados. La degradación muscular fue rápida en diploides y triploides, como indicaron los desenganches de las miofibrillas del sarcolema y los orgánulos hinchados desde el primer día *post mortem* en adelante. Los espacios interfibrilares e intermiofibrilares, las disrupciones en el sarcolema-endomisio y las vacuolas autofágicas incrementaron desde el tercer al séptimo día en ambos grupos de ploidía, permaneciendo constantes hasta el día 14 *post mortem*, mientras que los procesos autofágicos fueron más marcados después de los 7 días. Las alteraciones musculares *post mortem* fueron más marcadas en el grupo de triploides. De este modo, los mecanismos autofágicos y el porcentaje de desenganches interfibrilares fue mayor en los rodaballos triploides que en los diploides. La firmeza de la carne no se vio afectada por el nivel de ploidía en las distintas etapas *post mortem*.





5. DISCUSIÓN GENERAL



5. DISCUSIÓN GENERAL

El presente estudio contribuye a aumentar el conocimiento de la biología de los rodaballos triploides inducidos mediante choque térmico frío, con especial atención a las características de calidad del producto final. Los resultados de dicho estudio podrán ser utilizados por la industria acuícola para valorar la posibilidad de cultivar rodaballos triploides a escala comercial y así diversificar el tamaño de venta de esta especie e incluso implementar el engorde en jaulas evitando el posible impacto genético asociado a los escapes.

Esta discusión sigue en gran medida el orden de los capítulos, pero se ha estructurado para abordar específicamente los resultados más relevantes.

5.1. VERIFICACIÓN DE LA TRIPLOIDÍA POR EL EFECTO SOBRE LA DOSIS CROMOSÓMICA

La técnica de inducción a la triploidía en rodaballo por choque térmico frío no es siempre efectiva al 100% y por eso la triploidía debe ser confirmada en una muestra significativa de los individuos nacidos de los huevos sometidos a este tratamiento. Con la inducción a la triploidía se generan rodaballos viables con tres conjuntos de cromosomas homólogos en lugar del habitual número de dos. Es precisamente esta característica la que ha permitido diseñar un método para confirmar la triploidía en el rodaballo mediante el uso de marcadores moleculares microsatélite y basado en la cuantificación del ADN.

El desarrollo del mapa genético del rodaballo (Bouza *et al.*, 2007) y la localización de los centrómeros (Martínez *et al.*, 2008) permite conocer la posición de los marcadores y estimar su frecuencia de recombinación con los centrómeros. Si la distancia entre un marcador específico y el centrómero es grande tendrá lugar el cruzamiento entre cromosomas homólogos, obteniéndose gametos heterocigóticos femeninos. Si además el macho no comparte ningún alelo con la hembra para un marcador específico, los triploides mostrarán tres alelos diferentes en su genotipo.

El método diseñado en este estudio es fiable, barato y se puede llevar a cabo a cualquier edad a partir de pequeñas muestras de tejido. Los individuos triploides heterocigotos son fácilmente identificados por la presencia de genotipos con tres alelos diferentes, presentando tres picos en el análisis del secuenciador automático. Esta técnica ha sido capaz de identificar

los triploides con un 100% de precisión en todos los individuos de los cinco cruzamientos analizados. Este porcentaje de identificación de triploides fue mayor que el descrito en salmón real (*Oncorhynchus tshawytscha*) utilizando siete marcadores moleculares microsatélite de forma independiente (72.5%; Garner *et al.*, 2008).

La probabilidad de detectar individuos triploides con genotipos de tres alelos diferentes para un locus no es posible si la madre es homocigota para este locus; disminuye si ambos padres comparten uno o dos alelos en este locus; y es dependiente de la frecuencia de recombinación entre el locus analizado y el centrómero en la madre. El análisis genético previo y el diseño de cruces adecuado de los reproductores ayuda a evitar un exceso de homocigotos debido a la endogamia, teniendo en cuenta el carácter hipervariable de estos marcadores. Si se cumplen estos requisitos, los patrones de genotipado mostrarán mayoritariamente tres alelos diferentes, maximizando así la eficacia de la herramienta en la identificación de triploides. La herramienta también fue testada para la detección de la triploidía en muestras de rodaballo de las que no se disponía de información parental, siendo efectiva también en estas condiciones, obteniendo una identificación de triploides de un 93%. Este punto es importante ya que no siempre se disponen de los datos de parentesco, y si la herramienta no fuese efectiva sin conocer la información parental, la identificación de triploides requeriría análisis adicionales.

Por otro lado, el desarrollo de herramientas moleculares siguiendo la estrategia descrita en este trabajo puede ser aplicable a un número importante de especies acuícolas en las que se disponga de marcadores moleculares adecuados.

5.2. EFECTO SOBRE LA APOPTOSIS DE LEUCOCITOS

En general los peces triploides tienen la misma talla que sus homólogos diploides, pero se componen de un menor número de células para compensar el efecto del incremento en volumen celular debido a una mayor dotación cromosómica (Benfey & Sutterlin, 1984). Estos cambios podrían influenciar las señales intracelulares y alterar la comunicación entre la superficie celular y el núcleo (Ballarin *et al.*, 2004), lo que afectaría al funcionamiento de sistemas complejos en los que son clave la interacción de la célula con el medio exterior y la comunicación inter e intracelular, como el sistema endocrino y el inmunitario. A este respecto, estudios realizados con neutrófilos de rodaballos diploides y triploides indican una actividad respiratoria y de fagocitosis similar (Budiño *et al.*, 2006). Tampoco se han

encontrado diferencias en la actividad del complemento y de los neutrófilos relacionadas con el nivel de ploidía en trucha (Yamamoto & Iida., 1995b). Sin embargo, hay discrepancias acerca de la resistencia de los peces triploides tras la estimulación con diferentes patógenos (Jhingan *et al.*; 2003, Ozerov *et al.*; 2010, Frenzl *et al.*; 2014), y en estudios recientes realizados con salmón, se han detectado diferencias en la expresión de genes relacionados con el sistema inmunitario entre peces diploides y triploides durante las infecciones con *Vibrio anguillarum* (Ching *et al.*, 2010) y *Piscirickettsia salmonis* (Correa *et al.*, 2014). Los resultados presentados en este estudio indican que el nivel de ploidía en rodaballo puede alterar la respuesta de los leucocitos cuando son expuestos a inmunomoduladores, lo que se traduce en una mayor muerte de las células triploides.

El desarrollo del sistema inmunitario y la respuesta inmune efectiva son procesos en los cuales es esencial un equilibrio entre la proliferación y la muerte celular (Rathmell & Thompson, 2002). La apoptosis está involucrada en la regulación de la respuesta inmune y la resolución de procesos infecciosos, por lo que tiene que ser minuciosamente controlada para que se desarrolle una respuesta inmune exitosa. La triploidía en el rodaballo podría afectar a la expresión de genes encargados de la regulación de la muerte celular programada en leucocitos como respuesta a diferentes estímulos. El tratamiento de leucocitos de riñón anterior con inmunomoduladores como la Fitohemaglutinina (PHA) y la Estaurosporina (St) provocan un incremento de la apoptosis en linfocitos, obteniéndose diferencias significativas en el caso de los triploides en comparación con los controles (células incubadas sólo con medio de cultivo) y también con respecto a los linfocitos diploides tratados con los mismos inmunomoduladores. Esta mayor susceptibilidad a la apoptosis de linfocitos de rodaballos triploides, junto con los resultados recientemente publicados en salmones, en los que observa una reducción de los linfocitos B en sangre y en riñón anterior de peces triploides (Fraser *et al.*, 2012b), sugieren que el nivel de ploidía podría afectar a la correcta activación de la respuesta inmune específica durante un proceso infeccioso o tras la vacunación, por lo que serían necesarios estudios futuros para dilucidar el efecto de la ploidía en la regulación de la respuesta inmune en rodaballos.

5.3. EFECTO SOBRE EL CRECIMIENTO SOMÁTICO Y LA CALIDAD DE LA CARNE

La naturaleza y frecuencia de aparición de malformaciones durante el crecimiento en peces cultivados varían entre las distintas especies, implican problemas relacionados con el

bienestar animal (Benfey, 2001) y reducen la calidad del producto final (Baeverfjord *et al.*, 2009). Las causas de las deformidades en peces de cultivo están asociadas normalmente a condiciones ambientales como la temperatura, la concentración de oxígeno, la densidad de estabulación, y factores nutricionales, además de la calidad de los gametos.

La producción de peces triploides ha estado siempre asociada con un incremento en la incidencia de malformaciones morfológicas, incluyendo anomalías en mandíbulas y aletas (Jungalwalla, 1991; McGreachy *et al.*, 1996; Oppedal *et al.*, 2003; Sadler *et al.*, 2001; Sutterlin *et al.*, 1987; Sutterlin & Collier, 1991), proporciones anormales de cola y tronco (Swarup, 1959), deformidades faciales (Tave, 1993a) y reducción en el número de vértebras (Tiwary & Ray, 2004). Otras alteraciones observadas en peces triploides incluyen la división del bazo, como ocurre en la trucha arco iris (Okada, 1985), la reducción del intestino y de número de ciegos pilóricos, como ocurre en bacalao y salmón Atlántico (Peruzzi *et al.*, 2013; 2015) y la mayor susceptibilidad a la aplasia del *septum transversum* del corazón, como ocurre en el salmón Atlántico (Fraser *et al.*, 2014). Estas diferencias podrían influenciar en la utilización de los nutrientes y en la respuesta a condiciones ambientales subóptimas y, por consiguiente, en el rendimiento de los triploides en comparación con los diploides. Las causas de las malformaciones no se conocen con exactitud, pero parece que la diferencia en la morfología celular y el incremento de la heterocigosis en peces triploides pueden afectar a los procesos de diferenciación celular, desarrollo y metabolismo (Sadler *et al.*, 2001). Otro factor importante a considerar es la falta de optimización de las condiciones de cultivo en estos peces, que además de ser genéticamente diferentes, han sufrido un proceso traumático en su desarrollo embrionario.

En el caso del rodaballo de cultivo, son frecuentes las malformaciones morfológicas, especialmente las relativas a deformidades esqueléticas y craneales, que pueden estar relacionadas con factores ambientales durante el cultivo o genéticos, y que impiden el correcto desarrollo de la metamorfosis (Ellis *et al.*, 1997). En el presente estudio, no se han encontrado diferencias en la incidencia de estas malformaciones entre rodaballos diploides y triploides, lo que excluye que la triploidía en sí, inducida por choque térmico frío, sea la causa de las alteraciones. Ninguna de las proporciones corporales estudiadas mostró diferencias significativas entre los rodaballos diploides y triploides de los dos grupos de edad estudiados. Tampoco se encontraron diferencias significativas en cuanto a desviaciones de la espina vertebral, número de vértebras y radios de las aletas. Estos resultados no coinciden con los

observados por Fjellidal & Hansen (2010) en salmón Atlántico, quienes observaron un mayor incremento de las deformidades vertebrales en triploides aunque, en este caso, la inducción a la triploidía en los salmones se realizó por choque hidrostático. Tampoco se ha encontrado efecto del nivel de ploidía sobre el índice de condición, el índice hepatosomático, el índice renal, el índice del bazo y el índice del corazón, que muestran valores similares en ambas ploidías. La única diferencia observada fue en el índice gonadosomático, que es mayor en los rodaballos diploides, debido a la esterilidad inducida por la triploidía en esta especie (Cal *et al.*, 2006), mientras que el índice de peso eviscerado es menor para ese mismo grupo.

El tejido muscular es la principal porción comestible del pez y es responsable de su valor nutricional. El patrón de crecimiento muscular se rige por las tasas de hipertrofia e hiperplasia muscular para alcanzar un determinado tamaño y varían según las especies y diferentes estirpes dentro de la misma especie (Weatherley *et al.*, 1979). El nivel ploidía influye en la celularidad muscular y en la calidad de la carne de algunas especies de peces como la trucha (Werner *et al.*, 2008) y el salmón (Johnston *et al.*, 1999). En estas especies los triploides presentaron mayor peso corporal y peso del filete y fibras musculares más grandes que en los diploides, sin embargo, los filetes de los triploides mostraron una menor calidad de la carne. En el rodaballo los triploides mostraron menor número de fibras, aunque de mayor tamaño que en los diploides. Estas diferencias muestran la existencia de diferentes patrones de crecimiento muscular entre ellos para alcanzar el mismo tamaño corporal, con mayor hipertrofia en triploides y mayor hiperplasia en diploides. Estas diferencias en la celularidad muscular coinciden con estudios previos realizados para evaluar el efecto de la ploidía en el crecimiento muscular de trucha arco iris (Suresh & Sheehan, 1998; Poontawee *et al.*, 2007; Werner *et al.*, 2008) y de salmón Atlántico (Benfey, 1999; Sigurgisladdottir *et al.*, 2001; Bjornevik *et al.*, 2004).

La comparación de la celularidad muscular y su correlación con los parámetros de textura es importante a la hora de encontrar alguna relación entre la estructura muscular, el nivel de ploidía y las características de la carne (Johnston *et al.*, 1999). En ambos grupos de ploidía la densidad de fibras musculares mostró una correlación positiva pero no significativa con parámetros texturales como la elasticidad, cohesividad, masticabilidad y adhesividad, mientras que el diámetro de las fibras mostró una correlación negativa pero no significativa con los mismos parámetros. Estos resultados, aunque difieren con los observados en otras especies de teleósteos (Hatae *et al.*, 1990; Hurling *et al.*, 1996; Johnston *et al.*, 2000), son

similares a los encontrados por Bjornevik *et al.* (2004) en salmón Atlántico, en los que no observó una relación entre densidad fibrilar o tamaño fibrilar con los parámetros texturales.

Se sabe que el nivel de ploidía tiene influencia en las propiedades de la carne de salmón Atlántico (Johnston *et al.*, 1999) y trucha arcoíris (Werner *et al.*, 2008). En estas especies se encontró que los peces triploides tenían mayor peso corporal y mayor peso del filete, además de fibras musculares más grandes que los diploides, sin embargo, los filetes de los triploides mostraban una peor calidad textural. En el caso del rodaballo, los parámetros de textura son similares entre rodaballos diploides y triploides lo que indica que, además de la celularidad muscular, otros factores pueden estar implicados en las propiedades texturales de la carne, tal y como sugirieron Periago *et al.* (2005) en un estudio realizado con lubina.

En la calidad de la carne influyen otros factores como la composición química y el contenido en grasa (Fauconneau *et al.*, 1995). Entre rodaballos diploides y triploides, los resultados no mostraron diferencias significativas en el contenido de proteínas, humedad, grasas totales y cenizas entre ambos grupos de ploidía. Resultados similares fueron encontrados por Hussain *et al.* (1995) comparando tilapias diploides y triploides. La composición lipídica en peces es muy variable ya que depende de los lípidos incluidos en la dieta, el periodo del año, la temperatura del agua, la salinidad, el fotoperiodo, la época de puesta, etc. (Codier *et al.*, 2002). En el presente estudio, los contenidos de ácidos grasos saturados (SAFA), monoinsaturados (MUFA) y poliinsaturados (PUFA), así como las proporciones de PUFA/SAFA no mostraron diferencias significativas entre ambos grupos de ploidía. Los perfiles de ácidos grasos fueron muy similares a los valores comúnmente citados para rodaballo (Martínez *et al.*, 2010), siendo el ácido palmítico el principal SAFA, el oleico el principal MUFA y el eicosapentanoico, docosahexanoico y linoleico los PUFA más abundantes. Ambos grupos de ploidía se mostraron como una buena fuente de ácidos grasos ω -3, particularmente del ácido eicosapentanoico y docosahexanoico. De hecho, el ácido eicosapentanoico (EPA) resultó el ácido graso más abundante en triploides y fue el único que mostró diferencias significativas entre ambos grupos de ploidía. Esta diferencia podría estar relacionada con la falta de maduración sexual en las hembras triploides que, al no utilizar estrógenos, podrían usar el ácido α -linoleico para la síntesis de EPA (Burdge *et al.*, 2002).

La concentración de minerales en especies de acuicultura está influenciada por muchos factores relacionados con diferencias biológicas (especies, talla, edad, sexo y maduración sexual), fuente de alimento y condiciones de cultivo (Alasavar *et al.*, 2002; Aubourg *et al.*,

2007; Uysal *et al.*, 2008). Las funciones principales de los minerales esenciales están relacionadas con la estructura esquelética, mantenimiento del sistema coloidal y la regulación del equilibrio ácido base. Los minerales también son un componente fundamental de las hormonas, enzimas y activadores enzimáticos (Khan *et al.*, 1987, Lal, 1995). En el presente estudio se analizó la composición mineral de la carne de rodaballos diploides y triploides, no encontrándose diferencias significativas entre ambos grupos en las cantidades de cada uno de los minerales analizados, ni tampoco en su composición mineral total.

Otros factores que alteran, con frecuencia, la calidad de la carne son el manejo y el almacenamiento de la misma. Las fases *post mortem* implican procesos químicos, físicos y bioquímicos, seguidos por un deterioro microbiológico que disminuye la frescura, modifica la estructura muscular y altera la calidad del filete (Delbarre-Ladrat *et al.*, 2006). Diferentes sistemas enzimáticos degradan los miofilamentos y los componentes del citoesqueleto, así como el armazón de tejido conectivo (Taylor *et al.*, 2002, Delarre-Ladrat *et al.*, 2006). El nivel de alteración de la carne varía entre las especies de teleósteos dependiendo de factores intra e interespecíficos (Davie & Sparksman, 1986; Ofstad *et al.*, 1996; Ayala *et al.*, 2011), y resultan en una importante pérdida económica (Johnston, 1999). En el rodaballo, la degradación *post mortem* estuvo influenciada por el nivel de ploidía, ya que los cambios musculares fueron más pronunciados en los ejemplares triploides que en los diploides. A nivel de la ultraestructura muscular, los desenganches de las miofibrillas del sarcolema y el hinchamiento de los orgánulos aparecieron en los triploides desde el día uno *post mortem*. A pesar de esta mayor incidencia de la degradación muscular en rodaballos triploides, la firmeza muscular no se vio afectada por el nivel de ploidía durante las distintas etapas *post mortem*.





6. CONCLUSIONES GENERALES



6. CONCLUSIONES GENERALES

1. El empleo de la herramienta de evaluación de la triploidía presentada en este estudio, basada en la utilización de marcadores moleculares microsatélite, es muy útil para la determinación de rodaballos triploides a partir de una pequeña muestra de tejido. Esta técnica económica, no invasiva, versátil y precisa, resulta fácil de implementar en los procesos de producción. El desarrollo de herramientas moleculares siguiendo la estrategia presentada en este estudio puede ser aplicado a un importante número de especies acuícolas si se dispone de los marcadores adecuados.
2. A nivel celular, existe una desregulación que puede conducir a un incremento en la apoptosis o muerte celular de los leucocitos de rodaballos triploides en respuesta a diferentes estímulos en comparación con sus congéneres diploides. Las alteraciones observadas en los triploides podrían afectar a la respuesta inmunitaria bajo diferentes condiciones, como infecciones y vacunas.
3. La inducción a la triploidía, mediante choque térmico frío, no afecta a la morfología general externa del cuerpo ni a las características esqueléticas de los rodaballos triploides cultivados en condiciones estándar, en comparación con sus hermanos diploides. Bajo estas condiciones de cultivo, la triploidía no supone una desventaja para la acuicultura comercial del rodaballo en cuanto a un incremento de la tasa de malformaciones.
4. Exceptuando el índice gonadosomático, las proporciones relativas de los órganos internos estudiados no están condicionadas por el nivel de ploidía. Los índices del hígado, del riñón, del bazo, del corazón, así como el índice de condición son similares entre rodaballos diploides y triploides. El índice gonadosomático es menor en triploides, presentando éstos un mayor peso eviscerado.
5. La celularidad del músculo blanco es diferente en rodaballos diploides y triploides, mostrando los triploides una menor densidad fibrilar y un mayor tamaño de sus fibras. Estas diferencias evidencian la existencia de diferentes patrones de crecimiento

muscular para alcanzar el mismo tamaño corporal, mayor hipertrofia en triploides e hiperplasia en diploides. Sin embargo, los parámetros texturales no están condicionados por el nivel de ploidía en rodaballo, presentando diploides y triploides valores similares de textura.

6. La composición nutricional de la carne de rodaballo no está condicionada por el nivel de ploidía. Los valores de contenido en proteínas, grasas totales, humedad y cenizas son similares entre rodaballos diploides y triploides. Los contenidos de ácidos grasos saturados (SAFA), monoinsaturados (MUFA) y poliinsaturados (PUFA), así como las proporciones PUFA/SAFA también son similares en diploides y triploides, constituyendo una buena fuente de ácidos grasos ω -3. El contenido mineral total, así como la cantidad de cada uno de los minerales analizados es similar entre rodaballos de ambas ploidías.
7. La degradación *post mortem* del tejido muscular en rodaballo está influenciada por el nivel de ploidía, siendo los desenganches de las miofibrillas del sarcolema y el hinchamiento de orgánulos más pronunciados en triploides que en diploides. Sin embargo, la firmeza muscular no se ve afectada por el nivel de ploidía a lo largo del proceso de degradación.
8. Si bien es necesario seguir ampliando el conocimiento sobre los efectos biológicos de la inducción a la triploidía en el rodaballo, la información presentada en este estudio puede ser considerada por el sector acuícola a la hora de valorar la implementación del cultivo de rodaballos triploides a escala comercial.



7. BIBLIOGRAFÍA



7. BIBLIOGRAFÍA

- Alasalvar, C., Taylor, K.D.A., Zubcov, E., Shahidi, F. & Alexis, M. (2002). Differentiation of cultured and wild sea bass (*Dicentrarchus labrax*), total lipids content, fatty acid and trace mineral composition. *Food Chem.*, 79: 145-150.
- Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Watson, J.D. (1994). *Biología molecular de la célula*. Omega, S.A (Ed.), Barcelona, 1298 pp.
- Aliah, R.S., Yamaoka, K., Inada, Y. & Taniguchi, N. (1990). Effects of triploidy on tissue structure of some organs in ayu. *Nippon Suis. Gak.*, 56: 569-575.
- Allendorf, F.W. & Leary, R.F. (1984). Heterozygosity in gynogenetic diploids and triploids estimated by gene-centromere recombination rates. *Aquaculture*, 43: 413-420.
- APROMAR. (2014). *La Acuicultura en España*. Asociación empresarial de productores de cultivos marinos de España. Fundación Observatorio Español de Acuicultura Ediciones, Madrid, 91 pp.
- Arai, K. (2000). Chromosome Manipulation in Aquaculture: Recent Progress and Perspective. *Jap. Aquacult. Soc.*, 48: 295-303.
- Arana, S., Tabata, Y.A., Sabino, M., Rigolino, M.G. & Hernandez-Blazquez, F.J. (2002). Differential effect of chronic aflatoxin B1 intoxication on the growth performance and incidence of hepatic lesions in triploid and diploid rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Arch. Med. Vet.*, 34: 253-263.
- Aubourg, S.P., Losada, V. & Prego, R. (2007). Distribution of lipids and trace minerals in different muscle sites of farmed and wild turbot (*Psetta maxima*). *Int. J. Food Sci. Tech.*, 42: 1456-1464.
- Ayala, M.D., Santaella, M., Martínez, C., Periago, M.J., Blanco, A., Vázquez, J.M. & López-Albors, O. (2011). Muscle tissue structure and flesh texture in gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.) fillets preserved by refrigeration and by vacuum packaging. *LWT Food Sci. Technol.*, 44: 1098-1106.
- Baeverfjord, G., Helland, S. & Hough, C. (2009). Control of malformation in fish aquaculture. Science and Practice. Federation of European aquaculture Producers (Ed). Liege, 149 pp.
- Ballarin, L., Dall'Oro, M., Bertotto, D., Libertini, A., Francescon, A. & Barbaro, A. (2004). Haematological parameters in *Umbrina cirrosa* (Teleostei, Sciaenidae): A comparison between diploid and triploid specimens. *Comp. Biochem. Physiol.*, 138A: 45-51.

- Basavaraju, Y., Mair, G.C., Kumar, H.M., Kumar, S.P., Keshavappa, G.Y. & Penman, D. J. (2002). An evaluation of triploidy as a potential solution to the problem of precocious sexual maturation in common carp (*Cyprinus carpio*) in Karnataka, India. *Aquaculture*, 204: 407-418.
- Beaumont, A., Boudry, P. & Hoare, K. (2010). Triploids and beyond: Why manipulate ploidy? En: Beaumont, A., Boudry, P. & Hoare, K. (Eds.), *Biotechnology and Genetics in Fisheries and Aquaculture*, Wiley-Blackwell, Oxford, UK, pp. 145-160.
- Benfey, T.J. & Sutterlin, A.M. (1984). Oxygen utilization by triploid landlocked Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Aquaculture*, 42: 69-73.
- Benfey, T.J., Bosa, P.G., Richardson, N.L. & Donaldson, E.M. (1988). Effectiveness of a commercial-scale pressure shocking device for producing triploid salmonids. *Aquacult. Engineer.*, 7: 147-154.
- Benfey, T.J., Dye, H.M., Solar, I.I. & Donaldson, E.M. (1989). The growth and reproductive endocrinology of adult triploid Pacific salmonids. *Fish Physiol. Biochem.*, 6: 113-120.
- Benfey, T.J. (1999). The physiology and behaviour of triploid fishes. *Rev. Fish. Sci.*, 7: 39-67.
- Benfey, T.J., & Biron, M. (2000). Acute stress response in triploid rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and brook trout (*Salvelinus fontinalis*). *Aquaculture*, 184: 167-176.
- Benfey, T.J. (2001). Use of sterile triploid Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) for aquaculture in New Brunswick. *ICES J. Mar. Sci.*, 58: 525-529.
- Bjornevik, M., Espe, M., Beattie, C., Nortvedt, R. & Kiessling, A. (2004). Temporal variation in muscle fibre area, gaping, texture, colour and collagen in triploid and diploid Atlantic salmon (*Salmo salar*, L.). *J. Sci. Food Agric.*, 84: 530-540.
- Blanc, J.M., Poisson, H. & Vallée, F. (1992). Survival, growth and sexual maturation of the triploid hybrid between rainbow trout and Arctic char. *Aquat. Living. Resour.*, 5: 15-21.
- Blanc, J.M., Maunas, P. & Vallée, F. (2005). Effect of triploidy on paternal and maternal variance components in brown trout, *Salmo trutta*. L. *Aquac. Res.*, 36: 1026-1033.
- Bonnet, S., Haffray, P., Blanc, J.M., Vallée, F., Vauchez, C., Faure, A. & Fauconneau, B. (1999). Genetic variation in growth parameters until commercial size in diploid and triploid freshwater rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and seawater brown trout (*Salmo trutta*). *Aquaculture*, 173: 359-375.
- Bouza, C., Sánchez, L. & Martínez, P. (1994). Karyotypic characterization of turbot (*Scophthalmus maximus*) with conventional, fluorochrome and restriction endonuclease-banding techniques. *Mar. Biol.*, 120: 609-613.

- Bouza, C., Hermida, M., Pardo, B.G., Fernández, C., Castro, J., Fortes, G.G., Sánchez, L., Presa, P., Pérez, M., Sanjuán, A., Comesaña, S., Álvarez-Dios, J.A., Calaza, M., Cal, R., Piferrer, F. & Martínez, P. (2007). A microsatellite genetic map in the turbot (*Scophthalmus maximus*). *Genetics*, 177: 2457-2467.
- Budiño, B., Cal, R.M., Piazzon, M.C. & Lamas, J. (2006). The activity of several components of the innate immune system in diploid and triploid turbot. *Comp. Biochem. Physiol.*, 145A: 108-113.
- Burdge, G.C. & Wootton, S.A. (2002). Conversion of alpha-linolenic acid to eicosapentaenoic, docosapentaenoic and docosahexaenoic acids in young women. *Br. J. Nutr.*, 88: 411-420.
- Cal, R.M. (2005). Triploidía y ginogénesis en el rodaballo (*Scophthalmus maximus* L.). Inducción, verificación y efectos sobre el crecimiento y la reproducción. Tesis Doctoral. Universidad de Vigo, España, 201 pp.
- Cal, R.M., Vidal, S., Camacho, T., Piferrer, F. & Guitian, F.J. (2005). Effects of triploidy on turbot haematology. *Comp. Biochem. Physiol.*, 141A: 35-41.
- Cal, R.M., Vidal, S., Gomez, C., Alvarez-Blazquez, B., Martinez, P. & Piferrer, F. (2006) Growth and gonadal development in diploid and triploid turbot (*Scophthalmus maximus*). *Aquaculture*, 251: 99-108.
- Cal, R., Terrones, J., Vidal, S., Martínez, P. & Piferrer, F. (2010). Differential incidence of gonadal apoptosis in triploid-induced male and female turbot (*Scophthalmus maximus*). *Aquaculture*, 307, 3-4.
- Carrasco, L., Doroshov, S., Penman, D.J. & Bromage, N. (1998). Long-term, quantitative analysis of gametogenesis in autotriploid rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *J. Reprod. Fertil.*, 113: 197-210.
- Carrasco, L.A.P. (1998). Citogenética. Master de Acuicultura. Universidad de Las Canarias. pp.1-31.
- Carrillo, M., Bayarri, J. & Zanuy, S. (2007). El control ambiental de la reproducción de los peces con especial referencia al control de los ciclos sexuales y de la pubertad en la lubina. En: *La Reproducción de los peces: Aspectos básicos y su aplicación en Acuicultura*. Carrillo, M. (Ed.), Observatorio Español de Acuicultura, Madrid, pp. 173-233.
- Ching, B., Jamieson, S., Heath, J.W., Heath, D.D. & Hubberstey, A. (2010). Transcriptional differences between triploid and diploid Chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*) during live *Vibrio anguillarum* challenge. *Heredity*, 104: 224-234.
- Chourrout, D., Chevassus, B., Krieg, F., Happe, A., Burger, G. & Renard, P. (1986). Production of second generation triploid and tetraploid rainbow trout by mating tetraploid males and diploid females-potential of tetraploid fish. *Theor. Appl. Gen.*, 72: 193-206.

- Cimino, M.C. (1972). Meiosis in triploid all-female fish (Poeciliopsis, Poeciliidae). *Science*, 175: 1484-1486.
- Codier, M., Brichon, G., Weber, J.M. & Zwingelstein, G. (2002). Changes in the fatty acid composition of phospholipids in tissues of farmed sea bass (*Dicentrarchus labrax*) during an annual cycle. Roles of environmental temperature and salinity. *Comp. Biochem. Physiol.*, 133B: 281-288.
- Correa, K., Filp, M., Cisterna, D., Cabrejos, M.E., Gallardo-Escárate, C. & Yáñez, J.M. (2014). Effect of triploidy in the expression of immune-related genes in coho salmon *Oncorhynchus kisutch* (Walbaum) infected with *Piscirickettsia salmonis*. *Aquac. Res.*, doi:10.1111/are.12584.
- Cuñado, N., Terrones, J., Sánchez, L., Martínez, P. & Santos, J.L. (2002). Sex-dependent synaptic behaviour in triploid turbot, (*Scophthalmus maximus*) (Pisces, Scophthalmidae). *Heredity*, 89: 460-464.
- Davie, P.S. & Sparksman, R.I. (1986). Burn tuna: an ultrastructural study of post-mortem changes in muscle of yellowfin tuna (*Thunnus albacares*) caught on rod and reel and southern bluefin tuna (*Thunnus maccoyii*) caught on handline or longline. *J. Food Sci.*, 51: 1122-1129.
- Delbarre-Ladrat, C., Chéret, R., Taylor, R. & Verrez-Bagnis, V. (2006). Trends in post-mortem aging in fish: understanding of proteolysis and disorganization of the myofibrillar structure. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, 46: 409-421.
- Donaldson, E.M., Devlin, R.H., Solar, I.I. & Piferrer, F. (1993). The reproductive containment of genetically altered salmonids. En: *Genetic Conservation of Salmonid Fishes*, Cloud, J.G. & Thorgaard, G.H (Eds), Plenum Press, Nueva York, pp. 113-129.
- Dorafshan, S., Kalbassi, M.R., Pourkazemi, M., Amiri, B.M. & Karimi, S.S. (2008). Effects of triploidy on the Caspian salmon *Salmo trutta caspius* haematology. *Fish Physiol. Biochem.*, 34: 195-200.
- Dunham, R.A. (2004). *Aquaculture and Fisheries Biotechnology. Genetic Approaches*. CAB International, Wallingford, 372 pp.
- Ellis, T., Howell, B.R. & Hayes, J. (1997). Morphological differences between wild hatcheryreared turbot. *J. Fish Biol.*, 50: 1124-1128.
- Estoup, A., Gharbi, K., San Cristobal, M., Chevalet, C., Haffray, P. & Guyomard, R. (1998). Parentage assignment using microsatellites in turbot (*Scophthalmus maximus*) and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) hatchery populations. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, 55: 715-725.
- FAO. (2009). Cultured aquatic species fact sheets. *Psetta maxima* (Linnaeus, 1758) [Scophthalmidae]. Fao.org.

- FAO. (2014). The State of World Fisheries and Aquaculture: Opportunities and challenges. Rome. 243 pp.
- Fauconneau, B., Alami-Durante, H., Laroche, M., Marcel, J. & Vallot, D. (1995). Growth and meat quality relations in carp. *Aquaculture*, 129: 265-297.
- Feindel, N.J., Benfey, T.J. & Trippel, E.D. (2010). Competitive spawning success and fertility of triploid male Atlantic cod *Gadus morhua*. *Aquacult. Environ. Interact.*, 1: 47-55.
- Felip, A., Zanuy, S., Carrillo, M., Martínez, G., Ramos, J. & Piferrer, F. (1997). Optimal conditions for the induction of triploidy in the sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.). *Aquaculture*, 152: 287-298.
- Felip, A. (2000a). Inducción de la triploidía y la ginogénesis en la lubina (*Dicentrarchus labrax* L.). Efectos sobre el crecimiento y la fisiología reproductiva. Tesis Doctoral. Universidad de Valencia, España, 263 pp.
- Felip, A., Zanuy, S., Carrillo, M. & Piferrer, F. (2001a). Induction of triploidy and gynogenesis in teleosts fish with emphasis on marine species. *Genetica*, 111: 175-195.
- Felip, A., Piferrer, F., Zanuy, S. & Carrillo M. (2001b). Comparative growth performance of diploid and triploid European sea bass over the first four spawning seasons. *J. Fish Biol.*, 58: 76-88.
- Felip, A., Zanuy, S. & Carrillo, M. (2006). Comparative analysis of growth performance and sperm motility between precocious and non-precocious males in the European sea bass (*Dicentrarchus labrax*, L.). *Aquaculture*, 256: 570-578.
- Fernández-Pato, C., Martínez-Tapia, C., Sánchez, J., Vázquez, E., Blanco, G., Criado A. & González, J. (1998). Comparison of growth, survival and body composition of diploid and triploid specimens of turbot (*Scophthalmus maximus*) to first sexual maturity. *Spec. Publ. Eur. Aquac. Soc.*, 26: 80-81.
- Fjelldal, P.G. & Hansen, T. (2010). Vertebral deformities in triploid Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) underyearling smolts. *Aquaculture*, 309: 131-136.
- Fjelldal, P.G., Lock, E.-J., Hansen, T., Wargelius, A., El-Mowafi, A. & Ørnsrud, R. (2011). Extra dietary phosphorous prevents vertebral deformities in triploid Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) smolts. *Interdisciplinary Approach in Fish Skeletal Biology Second Meeting, meeting abstract*, p. 33, 26-28 April, Tavira, Portugal.
- Fjelldal, P.G., Hansen, T.J., Lock, E.-J., Wargelius, A., Fraser, T.W.K., Sambaous, F., El-Mowafi, A., Albrektsen, S., Waagbø, R. & Ørnsrud, R. (2015). Increased dietary phosphorous prevents vertebral deformities in triploid Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Aquacult. Nutr.*, doi: 10.1111/anu.12238.

- Flajšhans, M., Psenicka, M., Rodina, M. & Tesitel, J. (2011). Image cytometric measurements of diploid, triploid and tetraploid fish erythrocytes in blood smears reflect the true dimensions of live cells. *Cell Biol. Int.*, 35: 67-71.
- Forés, R., Iglesias, J., Olmedo, M., Sánchez, F.J. & Peleteiro, J.B. (1988). Induction of spawning in turbot (*Scophthalmus maximus* L.) by sudden change in photoperiod. *Aquacult. Engineer.*, 9: 357-366.
- Fraser, T.W.K., Fjeldall, P.G., Hansen, T. & Mayer, I. (2012a). Welfare considerations of triploid fish. *Rev. Fish. Sci.*, 20: 192-211.
- Fraser, T.W.K., Rønneseth, A., Haugland, G.T., Fjellidal, P.G., Mayer, I. & Wergeland, H.I. (2012b). The effect of triploidy and vaccination on neutrophils and B-cells in the peripheral blood and head kidney of 0+ and 1+ Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) post-smolts. *Fish Shellfish Immunol.*, 33: 60-66.
- Fraser, T.W.K., Fleming, M.S., Poppe, T.T., Hansen, T. & Fjellidal P.G. (2014). The effect of ploidy and incubation temperature on survival and the prevalence of aplasia of the septum transversum in Atlantic salmon, *Salmo salar* L. *J. Fish Dis.*, 37: 189-200.
- Fraser, T.W.K., Mayer, I., Hansen, T., Poppe, T.T., Skjæraasen, J.E., Koppang, E.O. & Fjellidal, P.G. (2015). Vaccination and triploidy increase relative heart weight in farmed Atlantic salmon, *Salmo salar* L. *J. Fish Dis.*, 38: 151-160.
- Frenzl B., Migaud H., Fjellidal P.G., Shinn A.P., Taylor J.F., Richards R.H., Glover K.A., Cockerill D. & Bron J.E. (2014). Triploid and diploid Atlantic salmon show similar susceptibility to infection with salmon lice *Lepeophtheirus salmonis*. *Pest. Manag. Sci.*, 70: 982-988.
- Galbreath, P.F., Jean, W.S., Anderson, V. & Thorgaard, G. H. (1994). Freshwater performance of all-female diploid and triploid Atlantic salmon. *Aquaculture*, 128: 41-49.
- Garner, S.R., Madison, B.N., Bernier, N.J. & Neff, B.D. (2008). Juvenile growth and aggression in diploid and triploid Chinook salmon *Oncorhynchus tshawytscha* (Walbaum). *J. Fish Biol.*, 73: 169-185.
- Gillet, C., Vauchez, C. & Haffray, P. (2001). Triploidy induced by pressure shock in Artic charr (*Salvelinus alpinus*): Growth, survival and maturation until the third year. *Aquat. Living Resour.*, 14: 327-334.
- Gold, J.R. & Avise, J.C. (1976). Spontaneous triploidy in the California roach, *Hesperoleucus symmetricus* (Pisces: Cyprinidae). *Cytogenet. Cell. Genet.*, 17: 144-149.
- Grimmett, S.G., Chalmers, H.J., Wolf, J.C. & Bowser, P.R. (2011). Spinal deformity in triploid grass carp *Ctenopharyngodon idella* (Valenciennes). *J. Fish Dis.*, 34: 217-225.
- Haffray, P., Lebègue, E., Jeu, S., Guennoc, M., Guiguen, Y., Baroiller, J.F. & Fostier, A. (2009). Genetic determination and temperature effects on turbot *Scophthalmus maximus*

- sex differentiation: an investigation using steroid sex-inverted males and females. *Aquaculture*, 294: 30-36.
- Harris, J. & Bird, D.J. (2000). Modulation of the fish immune system by hormones. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, 77: 163-176.
- Hatae, K., Yoshimatsu, F. & Matsumoto, J.J. (1990). Role of muscle fibres in contributing firmness of cooked fish. *J. Food Sci.*, 55: 693-696.
- Holmefjord, I. & Refstie, T. (1997). Induction of triploidy in Atlantic halibut by temperature shocks. *Aquacult. Int.*, 5: 169-173.
- Howell, B.R., Baynes, S.M. & Thompson, D. (1995). Progress towards the identification of the sex determining mechanism of the *Solea solea* (L.), by induction of diploid gynogenesis. *Aquacult. Res.*, 26: 135-140.
- Hurling, R., Rodell, J.B. & Hunt, H.D. (1996). Fibre diameter and fish textural. *J. Texture Stud.*, 27: 679-685.
- Hussain, M.G., Rao, G.P.S., Humayun, N.M., Randall, C.F., Penman, D.J., Kime, D., Bromage, N.R., Myers, J.M. & McAndrew, B.J. (1995). Comparative performance of growth, biochemical composition and endocrine profiles in diploid and triploid tilapia *Oreochromis niloticus* L. *Aquaculture*, 138: 87-97.
- Ihssen, P.E., McKay, L.R., McMillan, I. & Phillips, R.B. (1990). Ploidy manipulation and gynogenesis in fishes: cytogenetic and fisheries applications. *Tran. Am. Fish. Soc.*, 119: 698-717.
- Imslund, A.K., Folkvord, A., Grung, G.L. & Stefansson, S.O. (1997). Sexual dimorphism in growth and maturation of turbot *Scophthalmus maximus* (Rafinesque, 1810). *Aquacult. Res.*, 28: 101-114.
- Inada, Y. & Taniguchi, N. (1991). Spawning behaviour and after-spawning survival in induced triploid ayu *Plecoglossus altivelis*. *Nippon Suis. Gak.*, 57: 2265-2269.
- Jhingan, E., Devlin, R.H. & Iwama, G.K. (2003). Disease resistance, stress response and effects of triploidy in growth hormone transgenic coho salmon. *J. Fish Biol.*, 63: 806-823.
- Johnson, R.M., Shrimpton, J.M., Heath, J.W. & Heath, D.D. (2004). Family, induction methodology and interaction effects on the performance of diploid and triploid chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*). *Aquaculture*, 234: 123-142.
- Johnson, R.M., Shrimpton, J.M., Cho, G.K. & Heath, D.D. (2007). Dosage effects on heritability and maternal effects in diploid and triploid Chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*). *Heredity*, 98: 303-310.

- Johnston, I.A., Strugnell, G., McCracken, M.L. & Johnstone, R. (1999). Muscle growth and development in normal-sex-ratio and all-female diploid and triploid Atlantic salmon. *J. Exp. Biol.*, 202: 1991-2016.
- Johnston, I.A., Alderson, R., Sandham, C., Dingwall, A., Mitchell, D., Selkirk, C., Nickell, D., Baker, R., Robertson, B., Whyte, D. & Springate, J. (2000). Muscle fibre density in relation to the colour and textural of smoked Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Aquaculture*, 189: 335-349.
- Johnston, I.A. (2006). Environment and plasticity of myogenesis in teleost fish. *J. Exp. Biol.*, 209: 2249-2264.
- Johnstone, R. (1985). Induction of triploidy in Atlantic salmon by heat shock. *Aquaculture*, 49: 133-139.
- Johnstone, R. & Stet, R.J.M. (1995). The production of gynogenetic Atlantic salmon, (*Salmo salar* L.). *Theor. Appl. Genet.*, 90: 819-826.
- Jones, A. (1972). Marine fish farming: An examination of the factors to be considered in the choice of species. Lab. Leaflet. Fish (New Ser.). Min. Agric. Fish. Food, 16 pp.
- Jungalwalla, P.J. (1991). Production of non-maturing Atlantic salmon in Tasmania. *Can. Tech. Rep. Fish. Aquat. Sci.*, 1789: 47-57.
- Khan, A.H., Ali, M., Biaswas, S.K. & Hadi, D.A. (1987). Trace elements in marine fish from the bay of Bengal. *Sci. Total Environ.*, 61: 121-130.
- Kjorsvic, E., Mangor-Jensen, A. & Holmefjord, I. (1989). Egg quality in marine fishes. *Adv. Mar. Biol.*, 26: 71-113.
- Konovalov, D.A., Manning, C. & Henshaw, M.T. (2004). KINGROUP: a program for pedigree relationship reconstruction and kin group assignments using genetic markers. *Mol. Ecol. Notes*, 4: 779-782.
- Krisfalusi, M. & Cloud, J.G. (1999). Gonadal sex reversal in triploid rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *J. Exp. Biol.*, 284: 466-472.
- Kusuda, R., Salati, F., Hamaguchi, M. & Kawai, K. (1991). The effect of triploidy on phagocytosis, leucocyte migration, antibody and complement levels of ayu, *Plecoglossus altivelis*. *Fish Shellfish Immunol.*, 1: 243-249.
- Lal, S.P. (1995). Macro and trace elements in fish and shellfish. En A. Ruiter (Ed.), *Fish and fishery products: composition, nutritive properties and stability*. CAB International, Wallingford, pp. 187-214.
- Le Comber, S.C. & Smith, C. (2004). Polyploidy in fishes: patterns and processes. *Biol. J. Linnean Soc.*, 82: 431-442.

- Leary, R.F., Allendorf, F.W., Knudsen, K.L. & Thorgaard, G.H. (1985). Heterozygosity and developmental stability in gynogenetic diploid and triploid rainbow trout. *Heredity*, 54: 219-225.
- Leclercq, E., Taylor, J.F., Fison, D., Fjellidal, P.G., Diez-Padrisa, M., Hansen, T. & Migaud, H. (2011). Comparative seawater performance and deformity prevalence in out-of-season diploid and triploid Atlantic salmon (*Salmo salar*) post-smolts. *Comp. Biochem. Physiol.*, 158A: 116-125.
- Luckenbach, J.A., Godwin, J., Daniels, H.V., Beasley, J.M., Sullivan, C.V. & Borski, R.J. (2004). Induction of diploid gynogenesis in southern flounder (*Paralichthys lethostigma*) with homologous and heterologous sperm. *Aquaculture*, 237: 499-516.
- Madsen, L., Arnbjerg, J. & Dalsgaard, I. (2000). Spinal deformities in triploid all-female rainbowtrout (*Oncorhynchus mykiss*). *Bull. Eur. Ass. Fish Pathol.*, 20: 206-208.
- Magadán, S., Hernández-Urcera, J. & Cal, R. (2009). Incremento de la apoptosis durante el desarrollo embrionario en rodaballo (*Scophthalmus maximus* L.) triploides. XII Congreso Nacional de Acuicultura. Madrid.
- Manning, A.J., Burton, M.P. & Crim, L.W. (2004). Reproductive evaluation of triploid yellowtail flounder, *Limanda ferruginea* (Storer). *Aquaculture*, 242: 625-640.
- Martínez, C., Miranda, J.M., Nebot, C., Rodríguez, J.L., Cepeda, A. & Franco, C.M. (2010). Differentiation of farmed and wild turbot (*Psetta maxima*): proximate chemical composition, fatty acid profile, trace minerals and antimicrobial resistance of contaminant bacteria. *Food. Sci. Technol. Int.*, 16: 435-441.
- Martínez, P., Hermida, M., Pardo, B.G., Fernández, C., Castro, J., Cal, R.M., Alvarez-Dios, J.A., Gómez-Tato, A. & Bouza, C. (2008). Centromere-linkage in the turbot (*Scophthalmus maximus*) through half-tetrad analysis in diploid meiogynogenetics. *Aquaculture*, 280: 81-88.
- Martínez, P., Bouza, C., Hermida, M., Fernández, J., Toro, M. A., Vera, M., Pardo, B., Millán, A., Fernández, C., Vilas, R., Viñas, A., Sánchez, L., Felip, A., Piferrer, F., Ferreiro, I. & Cabaleiro, S. (2009). Identification of the major sex-determining region of turbot (*Scophthalmus maximus*). *Genetics*, 183: 1443-1452.
- Martínez-Ruíz, N., Piferrer, F., Cal, R. & De Juan, J. (2009). Triploid impairs retinal plasticity in turbot. Association for Research in vision and Ophthalmology (ARVO), Annual Meeting. Florida, USA.
- Maxime, V. (2008). The physiology of triploid fish: Current knowledge and comparisons with diploid fish. *Fish Fish.*, 9: 67-78.
- McGreachy, S.A., O'Flynn, F.M., Benfey, T.J. & Friars, G.W. (1996). Saltwater performance of triploid Atlantic salmon in New Brunswick aquaculture. *Bull. Aqua. Assoc. Can.*, 96: 24-28.

- Molina-Luzón, M.J., López, J.R., Robles, F., Navajas-Pérez, R., Ruiz-Rejón, C., De la Herrán, R., Navas, J.I. (2015). Chromosomal manipulation in Senegalese sole (*Solea senegalensis* Kaup, 1858): induction of triploidy and ginogénesis. *J. Appl. Genet.*, 56: 77-84.
- Myers, J.M., & Hershberger, W.K. (1991). Early growth and survival of heat-shocked and tetraploid-derived triploid rainbow-trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture*, 96: 97-107.
- Ofstad, R., Egelanddal, B., Kidman, S., Myklebust, R., Olsen, R.L. & Hermansson, A.M. (1996). Liquid loss as affected by post mortem ultrastructural changes in fish muscle: cod (*Gadus morhua*, L.) and salmon (*Salmo salar*). *J. Sci. Food Agric.*, 71: 301-312.
- Ojolick, E.J., Cusack, R., Benfey, T.J. & Kerr, S.R. (1995). Survival and growth of all-female diploid and triploid rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) reared at chronic high temperature. *Aquaculture*, 131: 177-187.
- Okada, H. (1985). Studies on the artificial sex control in rainbow trout, *Salmo gairdneri*. *Sci. Rep. Hokkaido Fish Hatchery*, 40: 1-49.
- Oppedal, F., Taranger, G.L. & Hansen, T. (2003). Growth performance and sexual maturation in diploid and triploid Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) in seawater tanks exposed to continuous light or simulated natural photoperiod. *Aquaculture*, 215: 145-162.
- Opstad, I., Fjellidal, P.G., Karlsen, Ø., Thorsen, A., Hansen, T.J. & Taranger, G.L. (2013). The effect of triploidization of Atlantic cod (*Gadus morhua* L.) on survival, growth and deformities during early life stages. *Aquaculture*, 388: 54-59.
- Ozerov, M.Y., Lumme, J., Pääk, P., Rintamäki, P., Zietara, M.S., Barskaya, Y., Lebedeva, D., Saadre, E., Gross, R., Primmer, C.R. & Vasemägi, A. (2010). High *Gyrodactylus salaris* infection rate in triploid Atlantic salmon *Salmo salar*. *Dis. Aquat. Organ.*, 91: 129-136.
- Pala, I., Coelho, M.M. & Schartl, M. (2008). Dosage compensation by genecopy silencing in a triploid hybrid fish. *Curr. Biol.*, 18: 1344-1348.
- Periago, M.J., Ayala, M.D., López-Albors, O., Abdel, I., Martínez, O., García-Alcázar, A., Ros, G. & Gil, F. (2005). Muscle cellularity and flesh quality of wild and farmed sea bass *Dicentrarchus labrax* L. *Aquaculture*, 249: 175-188.
- Peruzzi, S., Rudolfson, G., Primicerio, R., Frantzen, M. & Kauric, G. (2009). Milt characteristics of diploid and triploid Atlantic cod (*Gadus morhua* L.). *Aquac. Res.*, 40: 1160-1169.
- Peruzzi, S., Jobling, M., Falk-Petersen, I.-B., Lein I. & Puvanendran, V. (2013). Gut morphology of diploid and triploid Atlantic cod, *Gadus morhua*. *J. Appl. Ichthyol.*, 29: 1104-1108.

- Peruzzi, E., Hagen, Ø. & Jobling, M. (2015). Gut morphology of diploid and triploid Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Aquacult. Int.*, 23: 1105-1108.
- Piferrer, F., Cal, R.M., Álvarez-Blázquez, B., Sánchez, L. & Martínez, P. (2000). Induction of triploidy in the turbot (*Scophthalmus maximus*) I. ploidy determination and the effects of cold shocks. *Aquaculture*, 188: 79-90.
- Piferrer, F., Cal, R.M., Gómez, C., Bouza, C. & Martínez, P. (2003). Induction of triploidy in the turbot (*Scophthalmus maximus*). II. Effects of cold shock timing and induction of triploidy in a large volume of eggs. *Aquaculture*, 220: 821-831.
- Piferrer, F., Cal, R.M., Gómez, C., Alvarez-Blázquez, B., Castro, J. & Martínez, P. (2004). Induction of gynogenesis in the turbot (*Scophthalmus maximus*): Effects of UV irradiation on sperm motility, the Hertwig effect and viability during the first 6 months of age. *Aquaculture*, 238: 403-419.
- Piferrer, F., Felip, A. & Cal, R.M. (2007). Inducción de la triploidía y la ginogénesis para la obtención de peces estériles y poblaciones monosexo en acuicultura. En: Espinosa, J. (Ed.), *Genética y Genómica en Acuicultura*, Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Madrid, pp. 401-472.
- Piferrer, F., Beaumont, B., Falguière, C.J., Flajšhans, C., Haffray, D.M. & Colombo, L. (2009). Polyploid fish and shellfish: Production, biology and applications to aquaculture for performance improvement and genetic containment. *Aquaculture*, 293: 125-156.
- Poontawee, K., Werner, C., Mueller-Belecke, A., Hoerstgen-Schwark, G. & Wicke, M. (2007). Flesh qualities and muscle fiber characteristics in triploid and diploid rainbow trout. *J. Appl. Ichthyol.*, 23: 273-275.
- Powell, M.D., Jones, M.A. & Lijalad, M. (2009). Effects of skeletal deformities on swimming performance and recovery from exhaustive exercise in triploid Atlantic salmon. *Dis. Aquat. Organ.*, 85: 59-66.
- Pradeep, P.J., Srijaya, T.C., Papini, A. & Anil, C.H. (2012). Effects of triploidy induction on growth and masculinization of red tilapia [*Oreochromis mossambicus* (Peters, 1852) x *Oreochromis niloticus* (Linnaeus, 1758)]. *Aquaculture*, 344: 181-187.
- Purdom, C.E. (1972). Induced polyploidy in plaice (*Pleuronectes platessa*) and its hybrid with the flounder (*Platichthys flesus*). *Heredity*, 29: 11-24.
- Queller, D.C. & Goodnight, K.F. (1989). Estimating relatedness using genetic markers. *Evolution*, 43: 258-275.
- Rathmell, J.C. & Thompson, C.B. (2002). Pathways of apoptosis in lymphocyte development, homeostasis, and disease. *Cell*, 109: 97-107.

- Sadler, J., Pankhurst, P.M. & King, H.R. (2001). High prevalence of skeletal deformity and reduced gill surface area in triploid Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Aquaculture*, 198: 369-386.
- Sánchez-Rodríguez, M. (1975). Contribution à l'étude de l'insemination artificielle de la truite (*Salmo gairdneri*): les possibilités de manipulation des gamètes et de conservation du sperme. DEA Physiology et Reproduction, Universidad Paris VI, Paris, 86 pp.
- Schafhauser-Smith, D. & Benfey, T.J. (2003). In vitro steroid production by triploid ovarian follicles. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 133: 279-286.
- Schreck, C.B., Contreras-Sánchez, W. & Fitzpatrick, M.S. (2001). Effects of stress on fish reproduction, gamete quality, and progeny. *Aquaculture*, 197: 3-24.
- Shrimpton, J.M., Sentlinger, A.M.C., Heath, J.W., Devlin, R.H. & Heath, D.D. (2007). Biochemical and molecular differences in diploid and triploid ocean-type chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*) smolts. *Fish Physiol. Biochem.*, 33: 259-268.
- Sigurgisladottir, S., Sigurgisladottir, M.S., Ingvarsdottir, H., Torrissen, O.J. & Hafsteinsson, H. (2001). Microstructure and texture of fresh and smoked Atlantic salmon, *Salmo salar* L., fillets from fish reared and slaughtered under different conditions. *Aquac. Res.*, 32: 842-848.
- Slater, C.H. & Schreck, C.B. (1997). Physiological levels of testosterone kill salmonid leukocytes in vitro. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 106: 113-119.
- Small, S.A., & Benfey, T.J. (1987). Cell-size in triploid salmon. *J. Exp. Zool.*, 241: 339-342.
- Suresh, A.V. & Sheehan, R.J. (1998). Muscle fiber growth dynamics in diploid and triploid rainbow trout. *J. Fish Biol.*, 52: 570-587.
- Sutterlin, A.M., Holder, J. & Benfey, T.J. (1987). Early survival and subsequent morphological abnormalities in landlocked anadromous and hybrid (landlocked×anadromous) diploid and triploid Atlantic salmon. *Aquaculture*, 64: 157-164.
- Sutterlin, A.M. & Collier, C. (1991). Some observation on the commercial use of triploid rainbow trout and Atlantic salmon in Newfoundland, Canada. *Can. Tech. Rep. Fish. Aquat. Scie.*, 1789: 89-96.
- Svobodová, Z., Flajšhans, M., Kolárová, J., Modrá, H., Svoboda, M. and Vajcová, V. (2001). Leukocyte profiles of diploid and triploid tench, *Tinca tinca* L. *Aquaculture*, 198: 159-168.
- Swarup, H. (1959). Effect of triploidy on the body size, general organization and cellular structure in *Gasterosteus aculeatus* (L.). *J. Genet.*, 56: 141-155.

- Taboada, X., Hermida, M., Pardo, B.G., Vera, M., Piferrer, F., Viñas, A., Bouza, C. & Martínez, P. (2014). Fine mapping and evolution of the major sex determining region in turbot (*Scophthalmus maximus*). *G3*, 4: 1871-1880.
- Taranger, G.L., Carrillo, M., Schulz, R.W., Fontaine, P., Zanuy, S., Felip, A., Weltzien, F.A., Dufour, S., Karlsen, Ø., Norberg, B., Andersson, E. & Hansen, T. (2010). Control of puberty in farmed fish. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 165: 483-515.
- Tave, D. (1993a). Growth of triploid and diploid bighead carp, *Hypophthalmichthys nobilis*. *J. Appl. Aquac.*, 2: 13-25.
- Tave, D. (1993b). Review of basic genetics. En: Genetics for Fish Hatchery Managers (2^a ed.), Van Nostrand Reinhold, New York, pp. 415.
- Taylor, J.F., Preston, A.C., Guy, D. & Migaud, H. (2011). Ploidy effects on hatchery survival, deformities, and performance in Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Aquaculture*, 315: 61-68.
- Taylor, J.F., Sambaous, F., Mota-Velasco, J., Guy, Hamilton, A., Hunter, D., Corrigan, D. & Migaud, H.R. (2013). Ploidy and family effects on Atlantic salmon (*Salmo salar*) growth, deformity and harvest quality during a full commercial production cycle. *Aquaculture*, 410: 41-50.
- Taylor, R.G., Fjaera, S.O. & Skjervold, P.O. (2002). Salmon fillet texture is determined by myofiber-myofiber and myofiber-myocommata attachment. *Food Chem. Toxicol.*, 67: 2067-2071.
- Terrones, J. (2002). Análisis morfológico y funcional del desarrollo gonadal y del crecimiento en el rodaballo (*Scophthalmus maximus*) diploide vs triploide. Tesis Doctoral. Universidad de Santiago de Compostela.
- Thorgaard, G.H. & Gall, A.C. (1979). Adult triploids in a rainbow trout family. *Genetics*, 93: 961-973.
- Thorgaard, G.H., Rabinovitch, P.S., Shen, M.W., Gall, G.A.E., Propp, J. & Utter, F.M. (1982). Triploid rainbow trout identified by flow cytometry. *Aquaculture*, 29: 305-309.
- Thorgaard, G.H. (1983). Chromosome set manipulation and sex control in fish, pp. 405-434 en *Fish Physiology*, Vol. IXB, editado por W. H. Hoar, D. J. Randall, & E. M. Donaldson. Academic Press, Nueva York.
- Thorgaard, G.H., Arbogast, D.N., Hendricks, J.D., Pereira, C.B. & Bailey, G.S. (1999). Tumor suppression in triploid trout. *Aquat. Toxicol.*, 46: 121-126.
- Thorpe, J.E. (2004). Life history responses of fishes to culture. *J. Fish Biol.*, 65: 263-285.
- Tiwary, B.K., Kirubakaran, R. & Ray, A.K. (2004). The biology of triploid Fish. *Rev. Fish. Biol.*, 14: 391-402.

- Tiwarly, B.K. & Ray, A.K. (2004). Alterations in air-sac and skeleton of triploid *Heteropneustes fossilis*. *J. Fish Biol.*, 64: 268-272.
- Toro, M.A., & López-Fanjul, C. (1998). Recent advances in animal breeding theory and its possible application in aquaculture. *Cah. Opt. Med.*, 34: 31-45.
- Trotter, J. (2000). WINMDI©. Version 2.9. La Jolla: The Scripps Research Institute.
- Utter, F.M., Johnson, O.W., Thorgaard, G.H. & Rabinovitch, P.S. (1983). Measurement and potential applications of induced triploidy in Pacific salmon. *Aquaculture*, 35: 125-135.
- Uysal, K., Emre, Y. & Kose, E. (2008). The determination of heavy metal accumulation ratios in muscle, skin and gills of some migratory fish species by inductively coupled plasma-optical emission spectrometry (ICP-OES) in Beymelek Lagoon (Antalya/Turkey). *Microchem. J.*, 90: 67-70.
- Vázquez, E., Fernández-Pato, C., Martínez-Tapia, I., Blanco G. & Sánchez, J.A. (1996). Rapid flow cytometry method for triploidy determination in turbot (*Scophthalmus maximus* L.). ICES C.M./F:8, 9pp.
- Vázquez, E., Fernández-Pato, C., Martínez-Tapia, I., Blanco, G. & Sánchez, J.A. (1998). Triploid induction in turbot (*Scophthalmus maximus* L.) using temperature shocks. *Spec. Publ. Eur. Aquac. Soc.*, 26: 268-269.
- Wagner, E.J., Arndt, R.E., Routledge, M.D., Latremouille, D. & Mellenthin, R.F. (2006). Comparison of hatchery performance, agonistic behavior, and poststocking survival between diploid and triploid rainbow trout of three different Utah strains. *N. Am. J. Aquacult.*, 68: 63-73.
- Walsh, P.S., Metzger, D.A. & Higuchi, R. (1991). Chelex® 100 as a medium for simple extraction of DNA for PCR-based typing from forensic material. *Biotechniques*, 10: 506-513.
- Watanabe, T., Tamiya, T., Oka, A., Hirata, C., Kitajima, C. & Fujita, S. (1983). Improvement of dietary value of live foods for fish larvae by feeding them on ω -3 highly unsaturated fatty acids and fat-soluble vitamins. *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.*, 50: 1015-1022.
- Weatherley, A.H., Gill, H.S. & Rogers, S.C. (1979). Growth dynamics of muscle fibres, dry weight, and condition in relation to somatic growth rate in yearling rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Can. J. Zool.*, 57: 2385-2392.
- Werner, C., Poontawee, K., Mueller-Belecke, A., Hoerstgen-Schwark, G. & Wicke, M. (2008). Flesh characteristics of pan-size triploid and diploid rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) reared in a commercial fish farm. *Arch. Tierz.-Arch. Anim. Breeding*, 51: 71-83.
- Yamamoto, A. & Iida, T. (1995a). Bacterial activity of serum of all-female triploid rainbow-trout. *Fish Pathol.*, 30: 123-124.

- Yamamoto, A. & Iida, T. (1995b). Non-specific defense activities of triploid rainbow trout. *Fish Pathol.*, 20: 123-124.
- Yamamoto, A. & Iida, T. (1995c). Susceptibility of triploid rainbow-trout to IHN, furunculosis and vibriosis. *Fish Pathol.*, 30: 69-70.
- Yamamoto, E. (1999). Studies on sex- manipulation and production of cloned populations in hirame (*Paralichthys olivaceus*) (Temminck & Schlegel). *Aquaculture*, 173: 235-246.
- You, F., Liu, J., Wang, X., Xu, Y., Huang, R. & Zhang, P. (2001). Study of embryonic development and early growth of triploid and gynogenetic diploid left-eye flounder, (*Paralichthys olivaceus*). *Chin. J. Oceanol. Limnol.*, 19: 147-151.
- Zanuy, S., Carrillo, M., Felip, A., Rodríguez, L., Blázquez, M., Ramos J. & Piferrer, F. (2001). Genetic, hormonal and environmental approaches for the control of reproduction in the European sea bass (*Dicentrarchus labrax*, L.). *Aquaculture*, 202: 187-203.







8. ANEXO



8. ANEXO

RELACIÓN DE COMUNICACIONES PRESENTADAS A CONGRESOS

A partir de las investigaciones llevadas a cabo en esta tesis doctoral se han presentado comunicaciones en congresos nacionales e internacionales. Las comunicaciones presentadas en formato póster son las siguientes:

Hernández-Urcera, J., Ayala, M.D., López-Albors, O., Periago, M.J., Martínez, C., Santaella, M., Lago, M.J. & Cal, R. (2013). Efecto de la triploidía sobre los parámetros musculares y nutricionales del rodaballo (*Scophthalmus maximus*, L.) después de su maduración sexual. XIV Congreso Nacional de Acuicultura. Gijón.

Ayala, M.D., **Hernández-Urcera, J.**, López-Albors, O. & Cal, R. (2013). Estudio de la celularidad en las diferentes regiones musculares de rodaballos diploides y triploides, *Scophthalmus maximus* L. XIV Congreso Nacional de Acuicultura. Gijón.

Hernández-Urcera, J., Ayala, M.D., López-Albors, O., Alonso, A. & Cal R. (2011). Efecto de la triploidía sobre los parámetros corporales y musculares del rodaballo (*Scophthalmus maximus*, L.). XIII Congreso Nacional de Acuicultura. Barcelona.

Ayala, M.D., Cal, R., **Hernández-Urcera, J.**, Blanco, A. & López-Albors, O. (2011). Evolución postmortem del tejido muscular en ejemplares diploides y triploides de rodaballo (*Scophthalmus maximus*, L.). XIII Congreso Nacional de Acuicultura. Barcelona.

Hernández-Urcera, J., Llunch, N., Cal, R. & Magadán-Mompó, S. (2011). The apoptosis in leucocytes may affect the immune response in triploid turbot (*Scophthalmus maximus*). Genomics in Aquaculture. Creta. Grecia.

Hernández Urcera, J., Vera, M., Magadán-Mompó, S., Pino-Querido, A., Cal, R. & Martínez, P. (2011). Development and validation of a molecular tool for assessing triploidy in turbot (*Scophthalmus maximus*). Genomics in Aquaculture. Creta. Grecia.

Magadán, S., **Hernández-Urcera, J.** & Cal, R. (2009). Incremento de la apoptosis durante el desarrollo embrionario en rodaballo (*Scophthalmus maximus* L.) triploides. XII Congreso Nacional de Acuicultura. Madrid.



Efecto de la triploidía sobre los parámetros musculares y nutricionales del rodaballo (*Scophthalmus maximus*, L.) después de su maduración sexual

J. Hernández-Urcera^a, M.D. Ayala^b, O. López-Albors^b, M.J. Periago^c, C. Martínez^c, M. Santaella^c, M.J. Lago^a, R. Cal^a

^aInstituto Español de Oceanografía. Centro Oceanográfico de Vigo, Planta Experimental de Cultivos Marinos de Vigo

^bDepto. Anatomía y Anatomía Patológica Comparada. Facultad de Veterinaria. Universidad de Murcia

^cDepto. Tecnología de los Alimentos, Nutrición y Bromatología. Facultad de Veterinaria. Universidad de Murcia

E-mail: rosa.cal@vi.ieo.es



Justificación

La inducción a la triploidía en peces normalmente produce esterilidad, por lo que en algunas especies esta técnica es utilizada para prevenir los efectos negativos que sobre el crecimiento y la calidad de la carne del pez se producen durante el proceso de reproducción (Cal *et al.*, 2006). Sin embargo, para que los peces triploides sean adecuados para la acuicultura deben presentar las mismas características nutricionales que los diploides. La celularidad muscular (número y tamaño de las fibras musculares) influye en la textura del filete y presenta gran plasticidad frente a factores genéticos y ambientales. El músculo blanco representa el mayor porcentaje del molusco y, por lo tanto, tiene un papel importante para parámetros clave en la calidad de la carne como la textura o el contenido de proteínas. Hernández-Urcera *et al.* (2011) estudiaron el efecto de la triploidía en la celularidad muscular de rodaballos inmaduros, pero hasta ahora no existía ningún estudio utilizando rodaballos después de su maduración sexual.

Objetivo

En el presente trabajo se evalúa el efecto de la triploidía en la celularidad muscular, en la textura y en las características nutricionales de rodaballos diploides y triploides después de la maduración sexual.

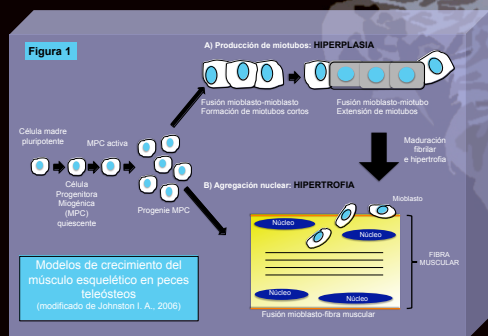
Material y Métodos

Se emplearon 2 lotes de rodaballo de 33 meses de edad: 7 diploides (2,197 g y 45,1 cm) y 7 triploides (2240 g y 45,3 cm), procedentes del Centro Oceanográfico de Vigo (IEO). Los individuos triploides se obtuvieron mediante inducción por choque térmico frío según Piferrer *et al.* (2003). El análisis de estructura muscular se realizó según la metodología aplicada por Hernández-Urcera *et al.* (2011).

La textura fue medida en el filete epiaxial craneal usando un texturómetro (Instron mod.1011) y los parámetros de textura derivados del TPA (análisis de perfil de la textura) elasticidad, firmeza, cohesividad, masticabilidad y gomosidad fueron calculados.

Los filetes frescos de los rodaballos diploides y triploides fueron homogenizados en un Omnimixer para los análisis de humedad, proteína, grasa total y contenido de cenizas. También se determinó el contenido de ácidos grasos por medio de cromatografía líquida de gases (Hewlett-Packard 5890) a partir de la extracción de los lípidos de la carne. La proporción relativa de cada ácido graso en el músculo de rodaballo fue expresada como porcentaje de los ácidos grasos totales. Las sumas de los ácidos grasos saturados (SAFA), los ácidos monoinsaturados (MUFA), los poliinsaturados (PUFA), el contenido total y el porcentaje entre los ácidos grasos ω3 y ω6 fue también calculado.

Los datos se analizaron con SPSS (versión 15.0). Se realizó el análisis de varianza (ANOVA, p<0,05).



Resultados

Los peces diploides mostraron menor tamaño medio de sus fibras musculares y mayor densidad fibilar que los triploides (Tabla 1), lo que indica diferentes mecanismos de crecimiento entre ambas poblaciones, con mayor hiperplasia en diploides y mayor hipertrofia en triploides (Figura 1).

Los valores de textura del filete no presentaron diferencias significativas entre ambas ploidias. Tampoco se observaron diferencias significativas en los parámetros físico-químicos analizados (Tabla 1).

Tabla 1. Valores medios, desviaciones estándar y significancia estadística de los parámetros musculares, texturales, físico-químicos y porcentajes de ácidos grasos (ns: no significancia estadística).

Parámetros analizados	Diploides (n=7, 8h y 3M)	Triploides (n=7, 8h y 3M)	p total
Parámetros musculares			
Dímetro Mínimo (µm)	90,37 ± 29,21	131,85 ± 34,25	p<0,001
Densidad fibilar (nº fibras/mm²)	123,47 ± 23,97	53,78 ± 7,79	p<0,001
Área Epiaxial Transversa M. Blanco (mm²)	1653,31 ± 327,38	1658,9 ± 304,65	ns
Parámetros texturales			
Elasticidad (mm)	4,51 ± 1,18	4,36 ± 0,59	ns
Firmeza (N)	50,43 ± 23,07	49,65 ± 13,78	ns
Cohesividad (%)	0,43 ± 0,03	0,39 ± 0,09	ns
Masticabilidad (N mm)	105,43 ± 62,04	97,68 ± 37,78	ns
Gomosidad (N)	21,59 ± 9,26	21,76 ± 5,99	ns
Parámetros físico-químicos			
Humedad (%)	71,19 ± 3,47	70,91 ± 0,98	ns
Ceniza (%)	1,02 ± 0,07	0,93 ± 0,15	ns
Proteína (%)	18,22 ± 1,38	18,89 ± 0,82	ns
Grasa (%)	8,46 ± 3,80	9,17 ± 1,09	ns
Ácidos grasos (%)			
SAFA (mg/100 g grasa)	27,95 ± 0,54	27,49 ± 0,20	ns
MUFA (mg/100 g grasa)	29,73 ± 0,34	29,51 ± 0,31	ns
PUFA (mg/100 g grasa)	42,33 ± 0,66	42,97 ± 0,24	ns
Total ω6 (mg/100 g grasa)	7,60 ± 0,41	7,32 ± 0,08	ns
Total ω3 (mg/100 g grasa)	34,73 ± 0,56	35,65 ± 0,28	ns
% ω3/ω6	0,22 ± 0,01	0,21 ± 0,00	ns
PUFA/SAFA	1,51 ± 0,05	1,56 ± 0,01	ns

Conclusiones

Estos resultados indican que, en rodaballo, las diferencias genéticas entre ambos lotes influyeron solamente en la celularidad muscular, no observándose diferencias en la textura ni en la composición nutricional.

Sería necesario realizar futuros estudios para comprobar cómo afecta el cocinado de la carne de rodaballos triploides a los parámetros estructurales del filete y a su aceptación por el consumidor.

Referencias

- Cal, R.M., Vidal, S., Gómez, C., Álvarez-Blázquez, B., Martínez, P., Piferrer, F. 2006. Growth and gonadal development in diploid and triploid turbot (*Scophthalmus maximus*). *Aquacultura*, 251: 99-108.
- Hernández-Urcera, J., M.D. Ayala, O. López-Albors y R. Cal. 2011. Efecto de la triploidía sobre los parámetros corporales y musculares del rodaballo (*Scophthalmus maximus* L.). *Actas del XIII Congreso Nacional de Acuicultura*.
- Johnston, I.A. 2006. Environment and plasticity of myogenesis in teleost fish. *The Journal of Experimental Biology*, 209: 2249-2264.
- Piferrer, F., Cal, R.M., Gómez, C., Bouza, C., Martínez, P. 2003. Induction of triploidy in the turbot (*Scophthalmus maximus*): effects of cold shock timing and induction of triploidy in a large volume of eggs. *Aquaculture*, 220: 821-831.

Agradecimientos

Los autores agradecen al personal de apoyo técnico de la Planta de Cultivos Marinos del IEO de Vigo, especialmente a Castora Gómez, la excelente labor realizada en el cuidado y muestreo de los rodaballos.



Estudio de la celularidad en las diferentes regiones musculares de rodaballos diploides y triploides, *Scophthalmus maximus* L.

UNIVERSIDAD DE MURCIA

M.D. Ayala¹, J. Hernández-Urcera², O. López-Albors¹ y R. Cal²¹Dept. Anat. y Anat. Patol. Comp. Fac. Veterinaria UMU; ² Centro Oceanográfico Vigo (IEO)

Summary

XIV CONGRESO NACIONAL DE ACUICULTURA
GIJÓN 2013 - Acuicultura, Naturalmente

The muscle cellularity was analyzed in four regions in two populations of turbot: 7 diploid and 7 triploid specimens. Diploid specimens showed higher values of the size and number of white fibres in the epaxial than in the hypoaxial zones, being such values higher in females than in males. In triploid specimens, the highest values of the muscle fibres size were found in the upper zones (epaxial and hypoaxial), whereas the lowest number and density of fibres was found in the epaxial upper zone. In relation to the sex influence in triploid, the lowest value of the muscle fibres size was found in females, whereas the rest of muscle parameters were higher in females. When comparing both groups, muscle hypertrophy was higher in triploid than in diploid specimens ($P < 0,05$), in all the muscle zones (1-4).

Material y métodos

Se estudiaron 4 regiones del miotomo: epiaxial superior (1), hipoaxial superior (2), epiaxial inferior (3) e hipoaxial inferior (4) en 7 rodaballos diploides (4 hembras y 3 machos) y 7 triploides (4 hembras y 3 machos), con un peso de \approx 2kg. Se analizó la celularidad muscular según Hernández-Urcera et al. (2011).

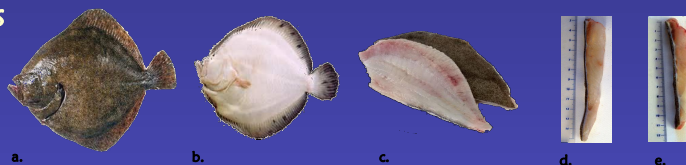


Fig 1. Rodaballo: Zonas superior e inferior (a,b). Filetes (c). Región hipoaxial superior de un rodaballo triploide (d) y un diploide (e).

Resultados y Discusión

✓ **En diploides**, el área transversal del músculo blanco, el tamaño y nº fibrilares fueron mayores en las regiones epiaxiales (1 y 3), mientras que la densidad fibrilar fue mayor en las regiones hipoaxiales (2 y 4) (Figs. 2, 3).

✓ **En triploides**, el tamaño fibrilar fue mayor en la región epiaxial superior, seguido de la región hipoaxial superior (Figs. 2, 3). El área transversal del músculo blanco mostró una tendencia similar. Sin embargo, la densidad fue mayor en la zona inferior (regiones 3 y 4), y el nº fibras fue menor en la región 1.

Estos resultados muestran que la asimetría del cuerpo de esta especie, junto con su comportamiento nadorio implica variaciones en la distribución fibrilar en las distintas regiones musculares, observándose también una influencia de la ploidía en tal distribución.

✓ **Al comparar ambas poblaciones de rodaballos**, se observa que el tamaño fibrilar es mayor en triploides en todas las regiones musculares (1-4), mientras que el nº y densidad fibrilar es mayor en diploides (Figs. 2, 3), que coincide con los resultados obtenidos por Hernández-Urcera et al. (2011, 2013) en la región epiaxial superior.

✓ **En relación al sexo**, en ambos grupos los parámetros musculares fueron mayores en hembras (con la excepción del tamaño fibrilar en triploides) (Fig. 3). El mayor crecimiento en hembras pone de manifiesto que, en el caso de los triploides, los machos siguen manteniendo niveles elevados de hormonas con el consiguiente deterioro asociado a la maduración gonadal.

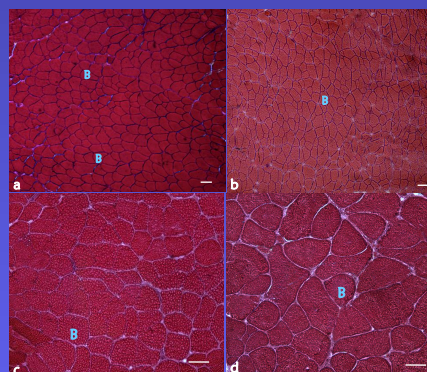


Fig 2. Secciones musculares de diploides (a-c) y triploides (d) obtenidos de las regiones epiaxial inferior (a), hipoaxial inferior (b) e hipoaxiales superiores (c,d). B: fibras blancas. Barra: 100 µm

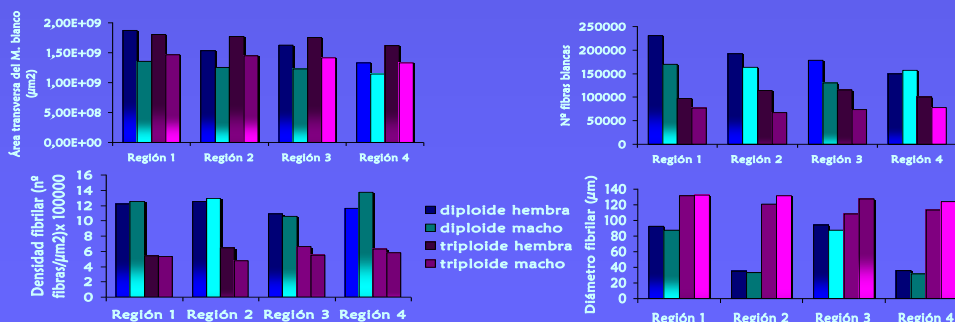


Fig 3. Parámetros musculares de rodaballos diploides y triploides en las 4 regiones del miotomo

Referencias:

Hernández-Urcera, J., M.D. Ayala, O. López-Albors, M.J. Periago, C. Martínez, M. Santaella, M.J. Lago y R. Cal. 2013. XIV Congreso Nacional Acuicultura. Gijón
Hernández-Urcera, J., M.D. Ayala, O. López-Albors, A. Alonso, y R. Cal. 2011. Actas del XIII Congreso Nacional Acuicultura. Barcelona

Agradecimientos: Este trabajo se ha realizado gracias a la colaboración entre el Centro Oceanográfico de Vigo (IEO) y la Universidad de Murcia.





Efecto de la Triploidía sobre los parámetros corporales y musculares del rodaballo (*Scophthalmus maximus*, L.)



J. Hernández-Urcera^a, M.D. Ayala^b, O. López-Albors^b, A. Alonso^c, R. Cal^a

^aInstituto Español de Oceanografía. Centro Oceanográfico de Vigo. Planta Experimental de Cultivos Marinos de Vigo

^bDepto. Anatomía y Anatomía Patológica Comparada. Fac. Veterinaria. Universidad de Murcia

^cDepto. Bioquímica, Genética e Inmunología. Universidad de Vigo

E-mail: rosa.cal@vi.ieo.es

Abstract

Muscle tissue and Body growth parameters were studied in diploid and triploid 22 months old turbot (*Scophthalmus maximus*, L.). Body length and body weight were similar between both groups. However, other body parameters differed between them, such that gonadosomatic index, epaxial fillet weight and white muscle transverse area were higher in diploid group, mainly in female specimens. On the other hand, muscle growth mechanism differed between both groups, such that muscle fibres size was greater ($p < 0.001$) in triploid specimens, whereas muscle fibre density was higher in diploid group, thus showing that genetic differences produced different muscle cellularity in both populations. Firmness values were higher in diploid than in triploid groups, although such differences were not significant ($p > 0.05$).

Introducción

La madurez sexual suele ejercer un efecto negativo sobre el crecimiento de los teleosteos, por lo que la triploidía, como induce esterilidad, se utiliza para prevenir dicha madurez y así mejorar el crecimiento. Trabajos previos en rodaballos triploides (Cal *et al.*, 2006) mostraron un mayor crecimiento en triploides que en diploides a partir de la maduración sexual. El tejido muscular comprende el 60-70% de la masa corporal. La celularidad muscular (número y tamaño de las fibras musculares) influye en la textura del filete (Hatae *et al.*, 1990), y presenta gran plasticidad frente a factores genéticos y ambientales (Johnston *et al.*, 1999). El presente trabajo evalúa el efecto de la triploidía en la conformación corporal y la celularidad muscular de rodaballos de 22 meses, próximos a la talla comercial.

Material y Métodos

Se emplearon 2 lotes de rodaballo de 22 meses: 14 diploides y 14 triploides, procedentes de una puesta de reproductores obtenida en junio de 2009 en el Instituto Español de Oceanografía (Centro Oceanográfico de Vigo). En cada ejemplar se midió la longitud, peso corporal e índices hepatosomático (IHS) y gonadosomático (IGS), siendo $IHS = 100 \times (\text{peso hígado/peso total})$ e $IGS = 100 \times (\text{Peso gónada/Peso total})$. Se midió también el peso de los lomos superior (epiaxial) e inferior (hipoaaxial) y se calculó el % total de músculo (vianda), que representa el % comestible. Posteriormente, en cada ejemplar se realizó la sección transversa en el punto medio de la longitud Standard para la determinación del Área Transversa Epiaxial del Músculo Blanco y se obtuvieron 4 bloques musculares de la zona epiaxial craneal, que, tras su congelación en 2-metilbutano (-80°C) sobre nitrógeno líquido, fueron crioseccionados (8µm) y teñidos con Hematoxilina/Eosina. En estas secciones se midieron el tamaño y densidad fibrilares, mediante un sistema de análisis de imagen. Los valores de textura fueron también medidos. Los datos se analizaron con SPSS (versión 15.0). Se realizó el análisis de varianza (ANOVA, $p < 0.05$).

Resultados

Los resultados se obtuvieron en rodaballos de 22 meses, y se muestran en las Tablas 1-3, considerando ambos sexos conjuntamente o por separado, según los datos sean similares entre sexos o no.

La **ratio macho/hembras** fue 1/0,3 y 1/1 en diploides y triploides, respectivamente, reflejando mayor % de hembras en triploides, tal como observaron Cal *et al.* (2006). El IGS fue mayor en las hembras diploides (Tabla 1), coincidiendo también con los resultados de los autores citados, e indican el inicio de la madurez sexual de los diploides, y su ausencia en los triploides.

La **longitud y peso corporales** fueron similares en ambas poblaciones del presente estudio.

El **peso del filete epiaxial** y el **Área transversa del M. Blanco** presentaron mayores valores en las hembras diploides (Figuras 2-3), aunque el % comestible no mostró diferencias. En relación con la **celularidad muscular**, la población diploide mostró menor tamaño medio de sus fibras musculares y mayor densidad fibrilar (Tabla 3), lo que indica diferentes modelos de crecimiento entre ambas poblaciones, con mayor hiperplasia en diploides y mayor hipertrofia en triploides (Figuras 1-2).

Los valores de **textura del filete** fueron ligeramente más altos en diploides que en triploides, aunque tales diferencias no fueron significativas ($p > 0.05$) (Tabla 3).

Tabla 1. Valores medios corporales.

Población	Longitud total (cm)	Peso total (g)	IGS (♀)	IHS	% Vianda
Rodaballos	38.52	1268.5	2.05	0.42	2.41
Diploide	38.52	1268.5	2.05	0.42	2.41
Triploide	39.15	1188.6	0.57	0.15	1.97

Tabla 2. Valores medios del factor de condición (Peso/longitud³) y del peso del filete.

Población	Factor de condición (♀)	Peso lomo superior (epiaxial) (g)
Rodaballos	0.022	222.5
Diploide	0.022	222.5
Triploide	0.020	174.2

Tabla 3. Valores medios musculares y texturales.

Población	Díámetro mínimo (µm)	Densidad fibrilar (nº fibras/mm²)	Textura (Newtons)	Área Transversa Epiaxial M. Blanco (mm²)
Rodaballos	85.6	130.9	102.1	1192.42
Diploide	85.6	130.9	102.1	1192.42
Triploide	100.3	96.1	92.2	935.63

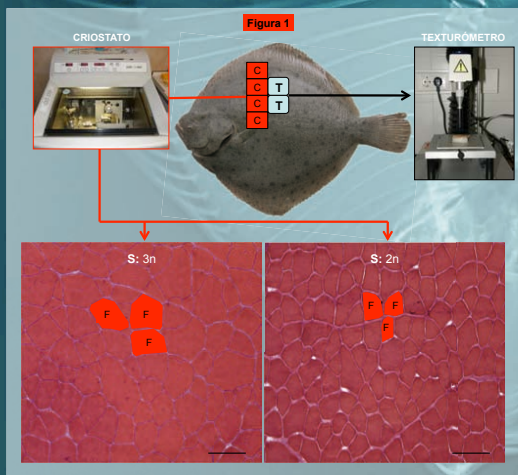
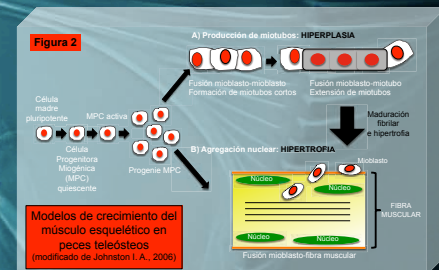


Figura 1. C: bloques para cortes (8µm) en criostato. T: bloques para análisis de textura. S: secciones musculares de rodaballos triploide (3n) y diploide (2n). Tinción hematoxilina/eosina. Barra=100 micras. F: análisis de fibras musculares (tamaño y densidad)



Conclusiones

Estos resultados indican que las diferencias genéticas entre ambos lotes influyeron principalmente en el IGS, el % de hembras y la celularidad muscular, observándose ligeras diferencias en la textura. Por ello, sería necesario ampliar el estudio a rodaballos de talla comercial (1500-1800 g) con el fin de determinar la influencia de la triploidía en las características del producto final.

Bibliografía

Cal R, M, S, Voz, C, Gómez B, Álvarez-Bilaspain, P, Martínez y F. Pillerer. 2006. Growth and gonadal development in diploid and triploid turbot (*Scophthalmus maximus*). *Aquaculture*, 251: 98-106.
 Heflie, K., F. Yoshimatsu y J. J. Matsumoto. 1990. Role of muscle fibres in contributing firmness of cooked fish. *Journal of Food Science*, 55: 593-600.
 Johnston, I. A., G. Stauguel, M. L. McCracken y R. Johnstone. 1999. Muscle growth and development in normal-sex-ratio and all-female diploid and triploid Atlantic salmon. *Journal of Experimental Biology*, 202: 1961-2010.
 Johnston, I.A. 2006. Environment and plasticity of myogenesis in teleost fish. *The Journal of Experimental Biology*, 209: 2249-2264.



Evolución postmortem del tejido muscular en ejemplares diploides y triploides de rodaballo (*Scophthalmus maximus*, L)



Ayala, M.D¹; Cal, R²; Hernández Urcera, J²; Blanco, A³; López-Albors, O¹
¹Dept. Anat. y Anat. Patol. Comparadas. Fac. Veterinaria. Universidad de Murcia
²Instituto Español de Oceanografía. Centro Oceanográfico de Vigo. Pl. Exp. Cultivos Marinos de Vigo
³Dept. Anat. Patol. Comparada. Fac. Veterinaria. Universidad de Córdoba

ABSTRACT

Muscle degradation was fast in diploid and triploid 22 months old turbot (*Scophthalmus maximus*, L), with detachment of myofibrils to sarcolemma and swollen organelles from 1 day postmortem. Muscle alterations were stronger in the triploid group, thus showing autophagic vacuoles from the first stage. After 3 days, results showed an increasing of interfibrillar and intermyofibrillar detachments, disruptions in sarcolemma-endomysium and autophagic vacuoles in both groups. However, the triploid group showed stronger ultrastructural alterations and higher percentage of interfibrillar detachments than the diploid group. After 7 and 14 days, ultrastructural alterations increased in both groups, thus showing strong autophagic mechanisms, mainly the triploid group. Detachments among fibres were higher after 7 and 14 days, with no significant differences between groups. Firmness values did not show significant differences among groups neither among stages.

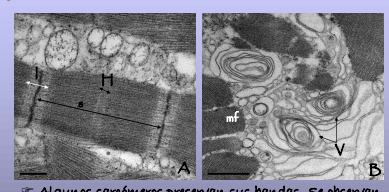
MATERIAL Y MÉTODOS

<p>RODABALLOS ANALIZADOS: 13 diploides y 13 triploides</p>	<p>T. MUESTRAS: Obtención de bloques musculares los días 1, 3, 7 y 14 postmortem</p>	<p>PROCESADO:</p> <ul style="list-style-type: none"> ➤ Congelación en N₂ líquido ➤ Fijación en glutaraldehído ➤ Medición Firmeza muscular en Texturómetro ➤ Criosecciones (8 µm) y tinción Hemat/eosina ➤ Inclusión en epxi y obtención de rejillas ➤ Análisis ultraestructural del músculo (M. electrónico) ➤ Dureza del filete 	<p>PARÁMETROS ANALIZADOS:</p> <ul style="list-style-type: none"> ➤ Cuantificación % desenganches interfibrilares (M. óptico) ➤ Análisis ultraestructural del músculo (M. electrónico) ➤ Dureza del filete
---	---	---	---

RESULTADOS

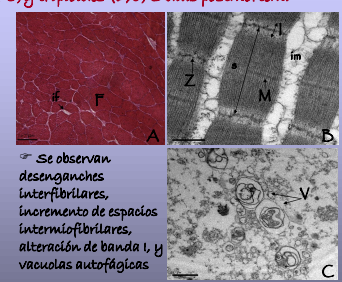
- Abreviaturas usadas en las Figs:**
- F: fibra muscular
 - mf: miofibrilla
 - if: desenganche interfibrilar
 - im: espacio intermiofibrilar
 - s: sarcómero
 - H: banda H
 - M: línea M
 - I: banda I
 - Z: línea Z
 - V: vacuolas autofágica
 - N: núcleo
 - rs: retículo sarcoplásmico
 - mi: mitocondrias

Fig. 1. Secciones musculares de rodaballos diploides (A) y triploides (B) 1 día postmortem.



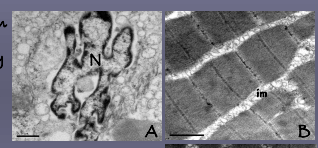
➤ Algunos sarcómeros preservan sus bandas. Se observan vacuolas autofágicas en triploides

Fig. 2. Secciones musculares rodaballos diploides (A-C) y triploides (D,E) 3 días postmortem.



➤ Se observan desenganches interfibrilares, incremento de espacios intermiofibrilares, alteración de banda I, y vacuolas autofágicas

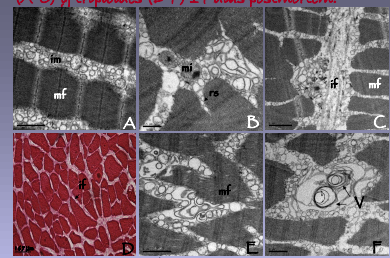
Fig. 3. Secciones musculares de rodaballos diploides (A,B) y triploides (C) 7 días postmortem.



➤ Se observan núcleos pleomórficos y alteración de sarcómeros

➤ Se evidencia centralización de núcleos y vacuolas autofágicas prominentes

Fig. 4. secciones musculares de rodaballos diploides (A-C) y triploides (D-F) 14 días postmortem.



➤ Todos los ejemplares muestran una gran proliferación del sistema membranso, lisis de miofilamentos, e incremento de vacuolas autofágicas.

Tabla 1. Porcentaje de desenganches interfibrilares (det %) y dureza (N: Newtons) en rodaballos diploides (Dipl.) y triploides (Tripl.).

	Días P.M.	Det (%)	Dureza (N)
Dipl.	3	37,4 ^a	102,06 ^a
	7	69,03 ^b	92,51 ^a
	14	67,1 ^b	108,63 ^a
Tripl.	3	54,1 ^a	92,18 ^a
	7	77,37 ^b	91,57 ^a
	14	78,17 ^b	110,92 ^a

Valores medios a los 3, 7 y 14 días postmortem (P.M.). Diferencias significativas indican diferencias significativas entre estadíos, dentro de cada población.

➤ El % de desenganches es mayor en la población triploide. La textura no mostró diferencias significativas entre estadíos ni entre poblaciones.

CONCLUSIONES

Los resultados muestran una rápida degradación postmortem en ambas poblaciones de rodaballos, con un incremento progresivo de desenganches interfibrilares y de procesos autofágicos. Tales procesos fueron más intensos en la población triploide, aunque los valores de firmeza no mostraron diferencias significativas entre ambas poblaciones. Estos resultados pueden estar relacionados, al menos en parte, con la diferente celularidad muscular entre ambos grupos, evidenciada por Hernández-Urcera et al. (2011).

Referencias:
 Hernández-Urcera, et al. 2011. Efecto de la triploidia sobre los parámetros corporales y musculares del rodaballo (*Scophthalmus maximus*, L.). XIII CNA Barcelona.



THE APOPTOSIS IN LEUCOCYTES MAY AFFECT THE IMMUNE RESPONSE IN TRIPLOID TURBOT (*Scophthalmus maximus L.*)



Jorge Hernández-Urcera*, Nuria Lluch[†], Rosa Cal[‡] and Susana Magadán-Mompó[§]
 * Oceanographic Center of Vigo, Spanish Institute of Oceanography (IEO), Subida a Radio Faro 50, 36390 Vigo, Pontevedra, Spain



Turbot (*Scophthalmus maximus L.*) is cultured fish specie of high economic importance in Europe, in which the triploidy induction is an interesting option. The benefit of triploidy is sterility condition, which avoids metabolic costs of sexual maturation and result in an increasing of somatic growth. In addition sterility avoids fish mortality related to spawning. Although polyploid fishes apparently maintain homeostasis on a whole animal level, on a subcellular level there can be process, such as transcription and signal transduction, affected. In polyploidy cells the nucleus and the total volume expand to accommodate the increase in genetic content and, these changes may affect cellular activity involving the plasma membrane and the communication from the cell surface to the nucleus.

One important aspect that should be considered before producing triploid fish commercially is how this condition affects to the immune response and resistance to diseases in comparison with diploid fish. Previous studies indicate that the activity of components of the innate immune system as serum lysozyme, complement and bactericidal activity were similar in diploid and triploid turbot. However, any work to evaluate the effect of triploidy in mechanisms, as apoptosis or programmed cell death, that play a key role in the regulation of the immune system has been performed.

So, the purpose of this study was comparing the apoptosis incidence in diploid and triploid leucocytes through the Annexin V - Propidium Iodide double staining Flow Cytometric assay. The data obtained after culturing Head Kidney leucocytes in presence of the mitogens Phorbol Myristate Acetate (PMA) and Phytohemagglutinin (PHA) and the apoptosis inducer Staurosporine indicate a higher percentage of apoptosis in triploid lymphocytes treated with PHA and in Staurosporine treated triploid lymphocytes and phagocytes.

These results raise the question if these differences in apoptosis induction could affect the immune response against pathogens, vaccines and the immunocompetence in triploid fishes.

Keywords: Triploid, turbot, apoptosis, leucocytes

[†] Corresponding author. Tel.: +34 986 462929; Fax: +34 986 498626

E-mail address: susana.magadan@i.eo.es (S. Magadán-Mompó).

MATERIALS AND METHODS

Induction and determination of triploidy in turbot

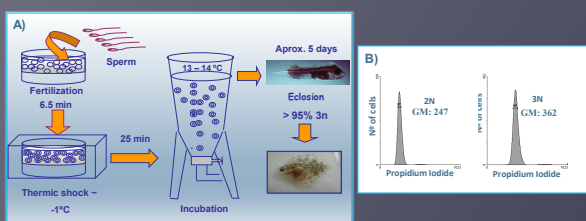


Figure 1: A) Fertilized eggs, obtained from one female and male, were divided into two groups. In one group triploidy was induced after fertilization by cold shock according to the protocol of Pifermer et al. (2000). The other group was not treated and was used as diploid control. B) The ploidy was confirmed by flow cytometry before eclosion, obtaining more than 95% of triploidy, and before performing apoptosis analysis. The protocol is based in the previously published by Darzynkiewicz (1997), quantifying the DNA level with propidium iodide. The fluorescence was measured using a flow cytometer (FC500MPL, Coulter FACS). The results analysis was performed with the WinMDI 2.9 software. To assess the triploidy, we determined the mean fluorescence intensity (GMean) and calculated the ratio sample-GMean to 2n-GMean. We considered triploid if the ratio is approximately 1.5.

Apoptosis in Head kidney leucocytes

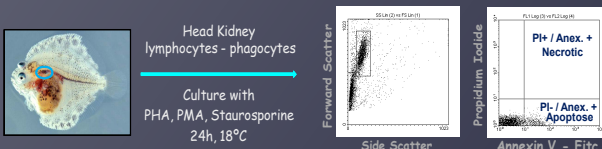


Figure 2: Ten diploid and triploid fishes (8-10 months old) were humanely killed with MS-222. Cell suspensions were obtained from head kidney (HK) by forcing fragments through a nylon mesh. To obtain the leucocytes the resulting cells were layered over Ficoll-PaqueTM solution centrifuged for 20 min at 500g at ambient temperature. The band of leucocytes above the Ficoll medium interface was collected, washed, and its viability determined by Trypan blue exclusion. Aliquots of 10⁶ of HK leucocytes were dispensed into the wells of a flat-bottomed 24-well microtiter plate (Nunc) and incubated with leucocytes activators: Phytohemagglutinin (PHA: 1µg/mL), Phorbol Myristate Acetate (PMA: 1µg/mL) and the apoptosis inducer Staurosporine (ST1: 0.125 and ST2: 0.06 µg/mL) during 24h. After incubation, cells were washed twice by centrifugation (400 × g, 5 min, 4 °C) and the level of apoptosis evaluated using a double staining flow cytometric assay combining Annexin V-FITC and Propidium Iodide (R&D systems kit) (Reynaud S.; 2004).

CONCLUSIONS

* This study shows different apoptosis level in diploid and triploid leucocytes in response to immunomodulator compounds like PHA and Staurosporine.

* The higher susceptibility to apoptosis could contribute to compromise immune response in triploid turbot.

REFERENCES

* Darzynkiewicz, Z., Juan, G., Xun, L., Goleczyca, W., Murakami, T., Traganos, F., 1997. Cytometry in cell necrobiology: Analysis of apoptosis and accidental cell death (necrosis). Cytometry 27, 1-20.
 * Pifermer, F., Cal, R.M., Alvarez-Blázquez, B., Sánchez, L., Martínez, P., 2000. Induction of triploidy in the turbot (*Scophthalmus Maximus*). I: ploidy determination and the effects of cold shocks. Aquaculture 188, 79-90.
 * Reynaud S., Duchiron C. and Deschaux P. 2004. 3-Methylcholanthrene induces lymphocyte and phagocyte apoptosis in common carp (*Cyprinus carpio L.*) in vitro. Aquatic toxicology 66, 307-318.

RESULTS

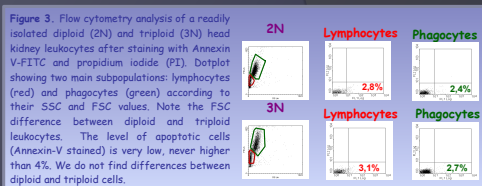


Figure 3: Flow cytometry analysis of a readily isolated diploid (2N) and triploid (3N) head kidney leucocytes after staining with Annexin V-FITC and propidium iodide (PI). Dotplot showing two main subpopulations: lymphocytes (red) and phagocytes (green) according to their SSC and FSC values. Note the FSC difference between diploid and triploid leucocytes. The level of apoptotic cells (Annexin-V stained) is very low, never higher than 4%. We do not find differences between diploid and triploid cells.

Effect of leucocyte activators PHA (1µg/mL), PMA (1µg/mL) and Staurosporine (ST1 0.125µg/mL and ST2 0.062µg/mL) on the viability of HK leucocytes after 24 hours in culture (Table 1). In cells treated with stimulators (PHA or PMA) we only observed a statistically significant increase of apoptosis compared with control (only medium) in triploid lymphocytes incubated with PHA. However, all samples except diploid lymphocytes, showed a statistically significant increase of apoptosis after staurosporine treatment. Results suggest a different susceptibility to apoptosis in cells with different ploidy level, and indicate HK lymphocytes are more resistant to staurosporine treatment than phagocytes. The percentage of necrotic cells remained low and no significant differences were observed (data not shown).

Results are expressed as mean±sd. Data represent 10 independent experiments. * denotes statistically significant differences (p<0.05) between treated and no treated cells at 24 h.

Table 1: Percentage of apoptotic HK leucocytes after 24h in culture.

Treatment	Lymphocytes		Phagocytes	
	2N	3N	2N	3N
Control	11.38±4.87	14.75±4.17	3.15±0.99	3.88±2.17
PHA	13.00±4.44	21.50±4.90*	4.50±2.07	6.38±1.93
PMA	11.00±4.38	14.50±5.01	3.38±1.06	4.13±1.81
ST1	17.13±5.38	26.50±6.97*	39.00±22.16*	50.38±20.92*
ST2	13.88±5.64	22.38±7.03*	32.26±22.20*	37.13±24.75*

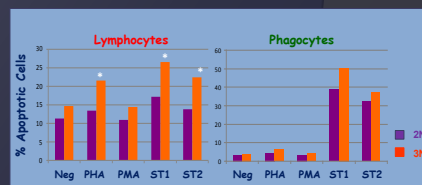


Figure 4. Percentage of apoptosis in diploid (2N) and triploid (3N) lymphocytes and phagocytes observed after 24h incubation with different immunomodulators. The level of apoptosis was statistically higher in triploid lymphocytes when those were cultured with PHA (1µg/mL) and Staurosporine (ST1 0.125 and ST2 0.062µg/mL). In contrast the response in phagocytes was different. Although the percentage of apoptotic cells is higher in triploid cells, it is not statistically significant. Results are expressed as mean±sd. Data represent 10 independent experiments. * denotes statistically significant differences (p<0.05) between treated and no treated cells at 24 h.





Development and validation of a molecular tool for assessing triploidy in turbot (*Scophthalmus maximus*)



^aHernández-Urcera J., ^bVera M., ^aMagadán-Mompó S., ^bPino-Querido A., ^aCal R., ^bMartínez P.

^aInstituto Español de Oceanografía, Centro Oceanográfico de Vigo, Planta Experimental de Cultivos Marinos, Vigo, Spain

^bUniversidad de Santiago de Compostela, Departamento de Genética, Facultad de Veterinaria, Lugo, Spain

E-mail: paulino.martinez@usc.es

Introduction

Turbot is a cultured fish species of high economic importance in Europe, in which the triploidy induction is an interesting option. The main benefit of triploidy is its sterile condition, which avoids metabolic costs of sexual maturation and result in an increasing of somatic growth. In addition sterility avoids fish mortality related to spawning and also the genetic impact of escapes of farmed fish on wild populations. Thus, tools for assessment of induced triploidy are necessary. Triploid fish have been identified by various indirect methods such as measurement of nuclear and cellular size of erythrocytes counting of nucleoli (NORs), electrophoresis of proteins and examination of morphology. Direct methods include chromosome counting by karyologic analysis and DNA content determination by flow cytometry.

More than 300 microsatellites have been described to date in the literature for turbot. The development of a genetic map including 250 microsatellites and the position of centromeres allows knowing the position of each marker and estimating its recombination probability to the centromere. The selection of a set of highly polymorphic centromere-distant microsatellites would permit the identification of triploids by a three-peak profile in automatic sequencers.

Objective

The aim of this work was to develop a cost-effective, non-invasive, versatile and accurate molecular tool starting from a set of highly polymorphic centromere-distant microsatellite loci for detecting triploids in turbot. The performance of this tool was compared with flow cytometry, one of the most accurate techniques for ploidy determination.

Methods

Families and triploidy induction

Fish used in this study were reared at the facilities of the Spanish Institute of Oceanography in Vigo (NW Spain) in 2009 and 2010. Five experimental crosses (I to V) were performed using eggs and sperm from a couple, excluding cross I, where three males and one female were used. In each cross, fertilized eggs were divided into two groups. In one group triploidy was induced after fertilization by cold shock according to Pferrer et al. (2000). The other group was not treated and was used as diploid control. Ploidy was examined in 8-15 month-old fishes by flow cytometry for an accurate individual validation.

Ploidy determination by Flow Cytometry (FC)

The protocol by Darzynkiewicz (1997) was applied for ploidy estimation. The cellular fluorescence was measured using a Coulter FACS flow cytometer (FC500MPL) and the WinMDI 2.9 software (Trotter, 2000).

DNA extraction, PCR amplification and microsatellite genotyping

DNA was extracted using the Chelex® Resin procedure (Walsh et al., 1991) from caudal fin samples obtained from used breeders and progenies. A set of seven highly polymorphic unlinked and far from centromeres microsatellite loci (see Table 1) were amplified following the PCR conditions reported by Pardo et al. (2006; 2007).

After checking the performance of all loci used (presence of null alleles and genotyping errors), the best four microsatellite loci were amplified together in a single multiplex PCR (Sma-USC12, Sma-USC24, Sma-USC29 and Sma-USC113). Loci were amplified and PCR products were resolved by using an ABI PRISM® 3730 automatic sequencer (Applied Biosystems). Allele scoring was performed with GeneMapper 4.0 software (Applied Biosystems). Individuals with three alleles in at least one of the four microsatellite loci tested were considered triploids (see Figure 1).

Table 1. Characteristics of the microsatellite loci used in this study indicating the number of alleles (A), gene diversity (He), heterozygote frequency (y) and frequency of null alleles (F_{null}).

Loci	A	He	y	F _{null}
Sma-USC12	17 ¹	0.932 ¹	0.958 ²	-0.001 ¹
Sma-USC24	16 ¹	0.913 ¹	0.848 ²	-0.036 ¹
Sma-USC27	14 ¹	0.834 ¹	0.771 ²	0.055 ¹
Sma-USC29	10 ¹	0.809 ¹	0.854 ²	0.016 ¹
Sma-USC31	9 ¹	0.772 ¹	0.646 ²	0.060 ¹
Sma-USC113	9 ²	0.751 ³	0.933 ²	0.035 ³
Sma-USC227	17 ²	0.931 ³	0.913 ²	0.105 ³

¹ From Pardo et al. (2006)

² From Martínez et al. (2008)

³ This study using the same 24 wild Cantabric individuals analyzed in Pardo et al. (2006).

Results

Correspondence between both techniques (cytometry and molecular tool) was 100%, except for cross III, where three individuals assigned as triploid by flow cytometry only showed two alleles with our molecular tool (Table 2). Both techniques detected individuals whose observed ploidy did not correspond with their expected one, highlighting the reliability of the molecular tool (Table 2). The percentage of triploid detection using the molecular tool was 97.9%.

Figure 1. Detection of triploid individuals for Sma-USC12 marker. The two upper and the two lower chromatograms correspond with diploid and triploid individuals, respectively.

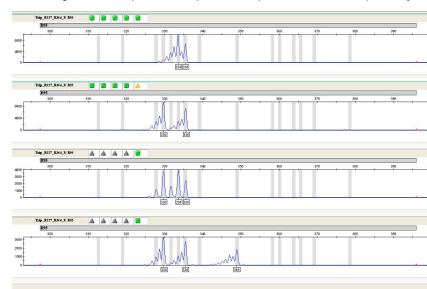


Table 2. Results for individuals induced to triploidy. "N" corresponds with the number of individuals analyzed, "Expected" corresponds with the expected ploidy of the individuals used, "Cytometry" corresponds with the observed results for this technique, "Molecular tool" corresponds with the ploidy observed using the multiplex microsatellite tool developed in this work, and "% Correct Assignment" is the percentage of correspondence between both techniques. Numbers between parentheses indicate individuals expected to one ploidy and assigned to a different ploidy by both techniques.

Cross	Expected	Cytometry	Molecular tool	% Correct Assignment
I	N	45	45	
	2n	20	15	100.0
	3n	25	25 (5)	100.0
II	N	56	56	
	2n	21	21 (2)	100.0
	3n	35	33	100.0
III	N	64	64	
	2n	39	39 (3)	100.0
	3n	25	22	86.4
IV	N	60	60	
	2n	30	30	100.0
	3n	30	30	100.0
V	N	60	60	
	2n	30	29	100.0
	3n	30	30 (1)	100.0
Total	N	285	285	
	2n	140	134 (5)	100.0
	3n	145	140 (6)	97.9

¹ The three triploid individuals misclassified were detected by invert dot out pattern.

Conclusion

The use of a set of 4 highly variable microsatellite loci proved to be a powerful method to evaluate the ploidy of the samples studied, with probabilities of triploidy detection of 100% in most of the crosses carried out.

Genomic resources are increasing quickly and microsatellites markers have been developed for several marine species in which it was found that triploidy can improve their culture performance. Therefore, the development of molecular tools for triploid detection, following the strategy described in this work, can be applied to an important number of marine aquaculture species if suitable markers are available.

References

- Darzynkiewicz, Z., Juan, G., Xun, L., Goreszyca, W., Murakami, T., Traganos, F., 1997. Cytometry in cell necrobiology: Analysis of apoptosis and accidental cell death (necrosis). *Cytometry* 27, 1-20.
- Martínez, P., Hermida, M., Pardo, B.G., Fernández, C., Castro, J., Cal, R.M., Álvarez-Díos, J.A., Gómez-Tato, A., Bouza, C., 2008. Centromere-linkage in the turbot (*Scophthalmus maximus*) through half-tetrad analysis in diploid meiotogonies. *Aquaculture* 280, 61-68.
- Pardo, B.G., Hermida, M., Fernández, C., Bouza, C., Pérez, M., Llavona, A., Sánchez, L., Martínez, P., 2006. A set of highly polymorphic microsatellites useful for kinship and population analysis in turbot (*Scophthalmus maximus* L.). *Aquac. Res.* 37, 1578-1582.
- Pardo, B.G., Fernández, C., Hermida, M., Vázquez, A., Pérez, M., Pires, P., Calaza, M., Álvarez-Díos, J.A., Comeas, A.S., Raposo-Guillán, J., Bouza, C., Martínez, P., 2007. Development and characterization of 248 novel microsatellite markers in turbot (*Scophthalmus maximus*). *Genome* 50, 329-332.
- Pferrer, F., Cal, R.M., Álvarez-Blázquez, B., Sánchez, L., Martínez, P., 2000. Induction of triploidy in the turbot (*Scophthalmus Maximus*). II. Ploidy determination and the effects of cold shocks. *Aquaculture* 188, 79-90.
- Walsh, P.S., Metzger, D.A., Higuchi, R., 1991. Chelex-100 as a medium for simple extraction of DNA for PCR-based typing from forensic material. *Biotechniques* 10, 506-513.



Incremento de la apoptosis durante el desarrollo embrionario en rodaballos (*Scophthalmus maximus* L.) triploides.



S. Magadán¹, J. Hernández-Urcera¹ y R. Cal¹

¹Instituto Español de Oceanografía, C.O. de Vigo, Cabo-Estai, Canido. Aptdo. 1552. 36200 Vigo.
susana.magadan@vi.ieo.es; jorge.hernandez@vi.ieo.es; rosa.cal@vi.ieo.es



JUSTIFICACIÓN DEL TRABAJO

El rodaballo (*Scophthalmus maximus* L.) es un especie marina, de gran interés comercial, en la que la inducción de triploidía es una opción interesante debido a la mayor proporción de hembras estériles que se obtienen. Estudios previos realizados con rodaballos adultos sugieren que los peces triploides tienen un menor número de células, las cuales son de mayor tamaño que los diploides (Cal R., et al., 2005; Budiño B., et. Al. 2006). Estas diferencias en número y tamaño podrían alterar la actividad celular y afectar al desarrollo, no sólo en individuos adultos, si no también en embriones y larvas. Así, el objetivo de este trabajo es evaluar si la triploidía en rodaballo tiene algún efecto en la apoptosis durante el desarrollo embrionario. Ya que una alteración en este proceso podría afectar a la supervivencia durante los primeros estadios del desarrollo, siendo un factor a tener en cuenta en el cultivo de estos peces triploides.

MATERIALES Y MÉTODOS

Obtención individuos: Los embriones de rodaballo se obtuvieron en las instalaciones del Centro Oceanográfico de Vigo tras la fertilización de ovocitos obtenidos mediante masaje abdominal. La producción de individuos triploides se realizó mediante el bloqueo de la segunda división meiótica con la aplicación de un choque frío a huevos fecundados. Individuos diploides (2n) y triploides (3n) fueron cultivados por separado y de la forma habitual hasta la eclosión. (Figura 1)

Obtención muestras: Se recogieron huevos/embriones cada 48-72 horas. Se realizaron dos lavados mediante centrifugación en Tampón fosfato salino estéril. Tras los lavados, los huevos se transfirieron a un filtro en el que, con ayuda del émbolo de una jeringuilla, son presionados obteniéndose una suspensión celular. El número y viabilidad celular se determinó bajo un microscopio óptico, mediante recuento con Azul Tripán en cámara de Neubauer.

Determinación triploidía y apoptosis mediante Citometría de Flujo: 5x10⁵ células (en 500 µL) fueron incubadas en presencia de 50 µL de una solución de Ioduro de Propidio (1mg/ml), 0,02% Tritón X-100 RNasa A (1mg/mL). La tinción fue analizada en el Citómetro de Flujo FC500, Beckman Coulter, CA, USA (Figura 2). En algunos casos para confirmar la presencia de apoptosis se utilizó el kit TACS Annexin-Fitc de RnDSystems.

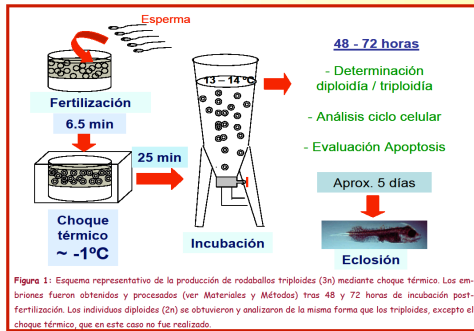


Figura 1: Esquema representativo de la producción de rodaballos triploides (3n) mediante choque térmico. Los embriones fueron obtenidos y procesados (ver Materiales y Métodos) tras 48 y 72 horas de incubación post-fertilización. Los individuos diploides (2n) se obtuvieron y analizaron de la misma forma que los triploides, excepto el choque térmico, que en este caso no fue realizado.

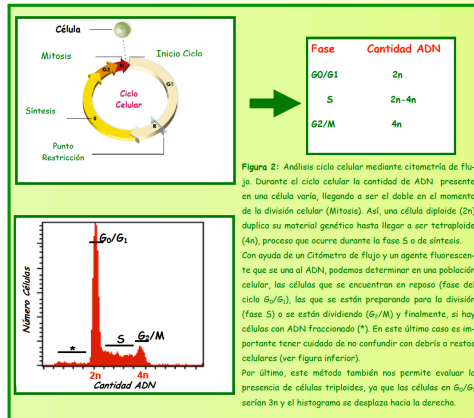


Figura 2: Análisis ciclo celular mediante citometría de flujo. Durante el ciclo celular la cantidad de ADN presente en una célula varía, llegando a ser el doble en el momento de la división celular (Mitosis). Así, una célula diploide (2n) duplica su material genético hasta llegar a ser tetraploide (4n), proceso que ocurre durante la fase S o de síntesis. Con ayuda de un Citómetro de Flujo y un agente fluorescente que se une al ADN, podemos determinar en una población celular, las células que se encuentran en reposo (fase del ciclo G₀/G₁), las que se están preparando para la división (fase S) o se están dividiendo (G₂/M) y finalmente, si hay células con ADN fraccionado (*). En este último caso es importante tener cuidado de no confundir con detritos o restos celulares (ver figura inferior). Por último, este método también nos permite evaluar la presencia de células triploides, ya que las células en G₀/G₁ serían 3n y el histograma se desplaza hacia la derecha.

RESULTADOS

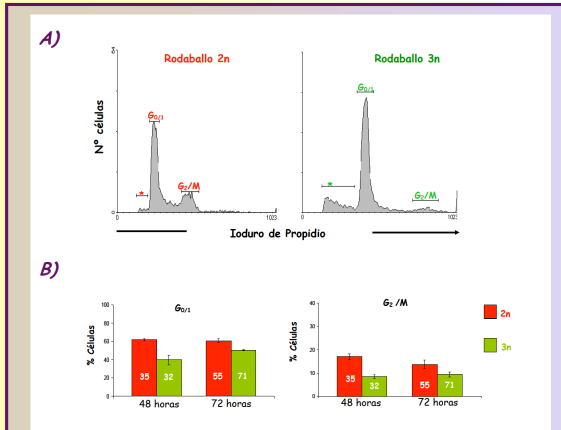


Figura 3: Análisis del ciclo celular de células embrionarias de rodaballos diploides (2n) y triploides (3n). A) Ejemplo representativo de los datos obtenidos por Citometría de Flujo con embriones de 48 horas. En el caso de individuos 2n apenas se detectan células en apoptosis, sin embargo, en individuos 3n el porcentaje de células con DNA fraccionado (Indicado como *) es superior (Bodnar et al. 1999). A su vez, el número de células que se encuentran en división (G₂/M) es mucho menor en individuos 3n. B) En la parte inferior de la figura se muestran los porcentajes de células en fase G₀/G₁ y en G₂/M en embriones 2n (en rojo) y 3n (en verde) a las 48 y 72 horas. Los datos se muestran como la media ± desviación estándar. El número de embriones analizados se indica en el interior de cada barra.

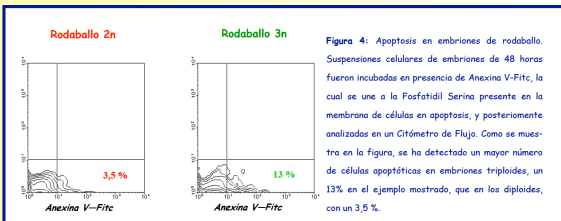


Figura 4: Análisis de apoptosis en embriones de rodaballo. Suspensiones celulares de embriones de 48 horas fueron incubadas en presencia de Anexina V-Fitc, la cual se une a la Fosfatidil Serina presente en la membrana de células en apoptosis, y posteriormente analizadas en un Citómetro de Flujo. Como se muestra en la figura, se ha detectado un mayor número de células apoptóticas en embriones triploides, un 13% en el ejemplo mostrado, que en los diploides, con un 3,5%.

CONCLUSIONES

- El análisis del ciclo celular de células embrionarias de rodaballo indica que, a las 48 y 72 horas post-fertilización, en embriones de rodaballo diploides hay un mayor porcentaje de células en proliferación (fase G₂/M) que en los embriones triploides.
- A su vez, hemos podido determinar mediante tinción con Anexina V-Fitc, que los embriones triploides presentan una mayor tasa de apoptosis a las 48 horas de desarrollo.
- Este retraso en el ciclo celular, así como el mayor índice de apoptosis podría tener un efecto en la supervivencia durante los primeros estadios del desarrollo, siendo un factor a tener en cuenta en el cultivo de estos peces triploides.
- Es necesario la realización de más estudios que confirmen estos resultados.

Bibliografía
 Bodnar E., Li X., Górczyca W., Melamed M.R. and Darzynkiewicz Z. 1999. Analysis of Apoptosis by Laser Scanning Cytometry. En: *Cytometry* 35: 181-195.
 Benfey TJ. 1999. A bibliography of triploid fish, 1943 to 1988. En: *Can. Tech. Rep. Fish. Aquatic Sci.* 1682 (33p).
 Budiño B., Cal R., Prazon M. C. and Lamas J. 2006. The activity of several components of the innate immune system in diploid and triploid turbot. En: *Comparative Biochemistry and Physiology, Part A* 145: 108-113.
 Cal R., Vidal S., Gamacho T., Piñero F. and Guisán F. 2005. Effect of triploidy on turbot haematology. En: *Comparative Biochemistry and Physiology*, Part A 141: 35-41.
 Hulata G. 2001. Genetic manipulation in aquaculture: a review of stock improvement by classical and modern technologies. En: *Genetica* 11: 155-173.



La morfología corporal, el sistema inmune específico, la celularidad muscular y la calidad de la carne de rodaballos triploides y diploides han sido examinados a partir de seis familias de rodaballo generadas en la Planta Experimental de Cultivos Marinos del Centro Oceanográfico de Vigo (IEO) a las que se les aplicó la inducción de la triploidía por choque térmico frío. Asimismo, ha sido diseñada una nueva herramienta para la detección de triploides basada en el uso de marcadores moleculares microsatélite. Los resultados que se presentan en este estudio contribuyen a aumentar el conocimiento sobre la biología de los rodaballos triploides de cara a la posibilidad de producir ejemplares estériles a escala comercial de una especie de la que Galicia es el principal productor de Europa.

