

## **EFFECTE DE LA TEMPERATURA SOBRE LA PROPORCIÓ DE SEXES DEL LLOBARRO (*Dicentrarchus labrax*)**

Laia Navarro-Martín, Mercedes Blázquez, Francesc Piferrer

Departament de Recursos Marins Renovables. Institut de Ciències del Mar, ICM-CSIC.

Passeig Marítim de la Barceloneta, 37-49. 08003 Barcelona. Tel. 932 309 500. Fax. 932 309 555. Adreça electrònica: [lnavarro@icm.csic.es](mailto:lnavarro@icm.csic.es).

---

### *Resum*

El llobarro (*Dicentrarchus labrax*) és una de les espècies en què el desenvolupament gonadal es veu alterat per la temperatura. La gònada primerament roman indiferenciada un període en el qual és molt sensible a estímuls externs. Animals indiferenciats van ser sotmesos a diferents temperatures des del moment de l'eclosió dels ous i durant diferents períodes. No es van trobar diferències en la longitud de les gònades dreta i esquerra respecte als tractaments, però es van trobar diferències en la longitud de les gònades femenines i masculines. L'índex gonadosomàtic en femelles va ser unes set vegades major que en mascles. Temperatures elevades de cultiu (21° C) al principi del desenvolupament van causar una masculinització dels individus. En canvi, temperatures baixes (15° C) aconseguiren augmentar fins a tres vegades la proporció de femelles respecte a la de les temperatures elevades dels controls (de 11,5 a un 35 %). D'aquests experiments i en conjunt amb els realitzats fins ara, es dedueix que no és possible feminitzar individus aplicant tractaments de temperatura, però sí que es pot evitar el fenomen de masculinització que apareix en cultius larvaris a altes temperatures.

**Paraules clau** Llobarro, diferenciació sexual, temperatura, aromatasa.

### *Abstract*

The European sea bass is a fish species in which temperature can modify the process of sex differentiation. The influence of the water temperature on the resulting sex ratios is maximal during the period in which sea bass gonads remain sexually undifferentiated and thus they are highly sensitive to external factors. Undifferentiated fish were reared at different water temperatures from hatching and during different periods. Sex ratios were determined one year later by histological examination of the gonads. No significant length differences were found between the left and right gonads among the different temperature regimes. However, differences in gonad length between sexes were found. Furthermore the gonadosomatic index was 7-fold higher in females than in males. High rearing temperatures (21° C) during early development can result in the masculinization of the fish. On the other hand, low rearing temperatures (15° C) increased the number of females 3-fold respect to those groups reared at high temperature (from 11.5% to 35%). From this and other previous experiments we can conclude that complete feminization of fish populations cannot be induced with different temperature regimes. However, low temperatures are capable to reduce and even eliminate the androgenesis-induced in the sea bass when reared at high temperatures.

**Key words** Sea bass, sexual differentiation, temperature, aromatase.

---

## **INTRODUCCIÓ**

És conegut que la temperatura afecta de manera significativa molts processos biològics, tant al metabolisme com a la fisiologia. Alguns vertebrats, entre els quals trobem amfibis, rèptils i alguns peixos, poden veure alterat el seu procés de diferenciació sexual per factors ambientals o socials. El llobarro (*Dicentrarchus*

*labrax*) és una espècie gonocorista (o de sexes separats), en què la gònada es desenvolupa de forma directa i en direcció caudocraneal (Roblin i Bruslé, 1983). Aquesta roman indiferenciada a l'inici del desenvolupament i és molt sensible a estímuls externs que poden decantar el procés de diferenciació envers testicles o ovaris. Aquest període de major sensibilitat és anomenat *període làbil*. Les femelles són les primeres a

diferenciar l'ovari, mentre els mascles resten un període més llarg indiferenciats. La diferenciació gonadal és més dependent de la talla que de l'edat (Blázquez *et al.*, 1999) i té lloc en peixos entre 8,3 i 11,8 cm (Saillant *et al.*, 2003). Aquesta plasticitat de la gònada fa que factors externs, entre els quals la temperatura té el major grau d'influència, alterin de forma significativa el desenvolupament gonadal. L'aromatasa (P450arom) és un dels enzims clau en la diferenciació sexual, encarregat de convertir els andrògens a estrògens, esteroides responsables del desenvolupament testicular i ovàric, respectivament. Elevades temperatures causen una supressió de l'expressió del gen P450arom en espècies com el *Paralichthys olivaceus* (Kitano *et al.*, 1999) o el peix zebra (Uchida *et al.*, 2004). Es podria pensar, doncs, que és necessària una repressió del gen per a desenvolupar la gònada envers un testicle, però no queda clar si és la temperatura la causa directa d'aquesta repressió o si actua des d'un altre punt de vista causant la repressió de l'aromatasa com a efecte secundari.

Prenent en conjunt diferents estudis d'alguns investigadors (vegeu la taula 1), es pot concloure que tant les elevades temperatures (20-21° C) com prolongats períodes de baixes (13-15° C) indueixen a la masculinització (Saillant *et al.*, 2002). En canvi, l'aparició de percentatges de femelles més elevats s'aconsegueix mantenint els peixos a baixes temperatures des del dia de fertilització fins a la meitat de la metamorfosi (17-18 mm) (Pavlidis *et al.*, 2000).

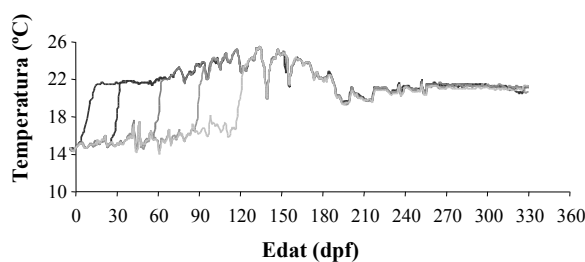
L'objectiu d'aquest estudi ha estat poder determinar amb més exactitud quins règims tèrmics afavoreixen

l'aparició de femelles i de mascles, i aclarir com la temperatura pot afectar el desenvolupament gonadal i a quin nivell.

## MATERIAL I MÈTODES

Per a realitzar els experiments s'utilitzaren ous fertilitzats d'elevada qualitat procedents d'una sola femella. Es van repartir en gobelets de PVC de 19 l a una densitat de 20.000 ous/gobelet. Els ous es van mantenir entre 13-14° C fins al moment de l'eclosió. Es van alimentar *ad libitum* amb artèmia, artèmia enriquida i pinsos de diferents mides en funció del grau de desenvolupament.

Els peixos, sexualment indiferenciats, es van sotmetre per duplicat a cinc règims tèrmics diferents: un grup control a 21° C des de l'eclosió dels ous i quatre grups cultivats a 15° C durant diferents períodes, al final dels quals es va incrementar la temperatura a 21° C (vegeu la figura 1). Aquests grups van ser anomenats *grup 30, 60, 90 i 120* en funció dels dies postfertilització mantinguts a 15° C. Els increments de temperatura de 15 a 21° C es van fer a raó d'1° C/dia. L'experiment es va repetir quatre vegades amb la progènie de quatre encreuaments de progenitors diferents. Es van recollir mostres de gònades durant el desenvolupament i a l'any amb la finalitat de realitzar anàlisis histològiques (determinació del sexe) i moleculars (nivells d'expressió de P450arom i de receptor d'andrògens). Finalitzat l'experiment s'agafaren dades de pes (g) i longitud (mm) de les gònades. Durant el desenvolupament es registraren dades de pes (g) i talla (cm) dels individus per a monitoritzar el creixement dels animals.



**Figura 1** Temperatures (° C) registrades en els diferents grups experimentals al llarg de l'estudi. dpf = dies postfertilització. Grups experimentals: control = mantingut a 21° C durant tot l'experiment; 30 = mantingut a 15° C des de l'eclosió fins a 30 dpf; 60 = mantingut a 15° C des de l'eclosió fins a 60 dpf; 90 = mantingut a 15° C des de l'eclosió fins a 90 dpf; 120 = mantingut a 15° C des de l'eclosió fins a 120 dpf. Acabats els diferents tractaments a 15° C es va incrementar la temperatura de cultiu a 21° C fins al final de l'experiment.

## RESULTATS

A les dues primeres famílies la proporció de femelles al grup control va ser d' $11,5 \pm 0,6\%$ . Els grups que van estar a temperatures baixes des de l'inici del desenvolupament van aconseguir augmentar tres vegades la proporció de femelles respecte al control (fins aproximadament el 35%), sense una clara relació entre temps de cultiu a 15° C i proporció de femelles produïdes. (Vegeu la taula 2.)

S'analitzaren els índexs gonadosomàtics (IGS) de mascles i femelles de cada grup i es va obtenir aproximadament un IGS set vegades major en femelles que en mascles (vegeu la taula 3). Es va realitzar una ANOVA d'una via per a mascles i un altra per a femelles, i es va observar el mateix patró de diferències en referència al tractament per als dos sexes.

Es va realitzar un estudi comparatiu entre la longi-

**Taula 1** Efecte de la temperatura en la proporció de sexes del llobarro.

Temp. (° C)	Període (dpf) <sup>a</sup>	Mitjana % femelles	Referència
22	15-57	5,8	Blázquez <i>et al.</i> (1998)
13	1-93	73,0	Pavlidis <i>et al.</i> (2000)
15	1-74	69,0	Pavlidis <i>et al.</i> (2000)
20	1-65	26,3	Pavlidis <i>et al.</i> (2000)
15	1-64	66,1	Koumoundouros <i>et al.</i> (2002)
15	1-38	47,1	Koumoundouros <i>et al.</i> (2002)
15	1-11	37,6	Koumoundouros <i>et al.</i> (2002)
20	1-56	18,1	Koumoundouros <i>et al.</i> (2002)
13	0-346	11,0	Saillant <i>et al.</i> (2002)
20	19-149	32,5	Saillant <i>et al.</i> (2002)
15	0-120	35,0	Navarro <i>et al.</i> (dades no publicades)
21	15-120	11,5	Navarro <i>et al.</i> (dades no publicades)

<sup>a</sup> dpf: dies postfertilització

**Taula 2** Percentatges de femelles ( $n = 14-49$  per rèplica).

Tractament	% femelles $\pm$ SD
Control	11,5 $\pm$ 0,60 <sup>a</sup>
30 dpf	32,7 $\pm$ 0,85 <sup>b</sup>
60 dpf	37,8 $\pm$ 8,76 <sup>b</sup>
90 dpf	30,7 $\pm$ 6,26 <sup>ab</sup>
120 dpf	37,8 $\pm$ 2,82 <sup>b</sup>

Diferents lletres indiquen diferències significatives en un test de Tuckey amb  $P < 0,05$ .

tud de les gònades dreta i esquerra i es va concloure que no existien diferències entre la longitud dreta i esquerra respecte als tractaments. En el cas de comparar la longitud de les gònades de les femelles amb les dels mascles es trobaren diferències entre sexes. La longitud mitjana de les gònades dretes era de  $35,6 \pm 7,3$  mm en el cas dels mascles, mentre que la de les femelles era de  $24,4 \pm 1,7$  mm. Les gònades esquerres mesuraven de mitjana  $36,9 \pm 7,6$  mm per als mascles i  $24,6 \pm 1,9$  mm en el cas de les femelles.

Quant a l'expressió d'aromatasa, es van trobar uns nivells majors ( $P < 0,01$ ) en femelles que en mascles, amb diferències significatives entre les femelles del grup 90 i les del grup control. L'expressió del receptor d'andrògens (AR) va resultar significativament major ( $< 0,05$ ) en mascles que en femelles. No obstant això, no es van trobar diferències entre sexes dins del grup de 90. (Vegeu la taula 4.)

## DISCUSSIÓ

Observant els resultats obtinguts quant a proporció de sexes dels diferents règims tèrmics podem afirmar que

les baixes temperatures aconseguen augmentar la proporció de femelles aproximadament tres vegades respecte els controls a altes temperatures. En estudis previs aquest increment va ser similar, encara que partint de proporcions de femelles en els controls més elevades i, en conseqüència, obtenint proporcions majors als tractaments de temperatures baixes —des d'un 18 a un 66% (Koumoundouros *et al.*, 2002) i des d'un 26 a un 73% (Pavlidis *et al.*, 2000). No obstant això, no es va aconseguir obtenir una feminització completa aplicant temperatures. D'aquí es pot deduir que les temperatures baixes no són suficients per a feminitzar els mascles genotípics i que, en canvi, temperatures altes decanten el procés de diferenciació envers mascles, masculinitzant les possibles femelles genotípiques.

Tant els resultats d'expressió de P450 com d'AR ens mostren que són bons indicadors de la presència de mascles o de femelles, respectivament. Així, seria interessant poder veure com varien aquests nivells durant el procés de desenvolupament gonadal.

## AGRAÏMENTS

A l'Elvira Martínez per l'ajuda en el manteniment dels peixos i a la Silvia Joly per la feina d'anàlisi molecular. Finançat pel projecte SEXRATIO AGL-2002-02636 a F. P. i per la beca del MEC AGL2002-02636 a L. N.

## BIBLIOGRAFIA

BLÁZQUEZ, M.; ZANUY, S.; CARRILLO, M.; PIFERRER, F. (1998). «Effects of rearing temperature on sex differentiation in the European sea bass (*Dicentrarchus labrax*, L)». *J. Exp. Zool.*, 281:207-216.

**Taula 3** Índex gonadosomàtic ( $n = 14-44$  per rèplica).

Tractament	Femelles (mitjana $\pm$ SD)	Mascles (mitjana $\pm$ SD)
Control	0,254 $\pm$ 0,0317 <sup>a</sup>	0,039 $\pm$ 0,0185 <sup>a</sup>
30 dpf	0,246 $\pm$ 0,0429 <sup>ab</sup>	0,027 $\pm$ 0,0119 <sup>ab</sup>
60 dpf	0,207 $\pm$ 0,0276 <sup>bc</sup>	0,036 $\pm$ 0,0430 <sup>bc</sup>
90 dpf	0,168 $\pm$ 0,0498 <sup>c</sup>	0,022 $\pm$ 0,0119 <sup>c</sup>
120 dpf	0,171 $\pm$ 0,0311 <sup>c</sup>	0,021 $\pm$ 0,0094 <sup>c</sup>

Diferents lletres indiquen diferències significatives en un test de Tuckey amb  $P < 0,01$ .

**Taula 4** Nivells d'expressió d'aromatasa i receptor d'andrògens ( $n = 2-10$ ).

Tractament	P450aromA/18S		AR/18S	
	Femelles	Mascles	Femelles	Mascles
Control	7,73 $\pm$ 1,305 <sup>ab</sup>	0,65 $\pm$ 0,029 <sup>d</sup>	1,88 $\pm$ 0,183 <sup>bc</sup>	3,33 $\pm$ 0,195 <sup>a</sup>
30 dpf	6,82 $\pm$ 0,949 <sup>ab</sup>	0,80 $\pm$ 0,067 <sup>d</sup>	2,06 $\pm$ 0,224 <sup>bc</sup>	2,93 $\pm$ 0,232 <sup>a</sup>
60 dpf	8,02 $\pm$ 1,194 <sup>bc</sup>	1,03 $\pm$ 0,103 <sup>d</sup>	1,50 $\pm$ 0,096 <sup>c</sup>	2,37 $\pm$ 0,211 <sup>ab</sup>
90 dpf	10,88 $\pm$ 0,620 <sup>c</sup>	1,04 $\pm$ 0,085 <sup>d</sup>	2,33 $\pm$ 0,140 <sup>bc</sup>	2,69 $\pm$ 0,197 <sup>ab</sup>
120 dpf	5,37 $\pm$ 1,498 <sup>a</sup>	1,27 $\pm$ 0,125 <sup>d</sup>	1,94 $\pm$ 0,672 <sup>c</sup>	3,23 $\pm$ 0,294 <sup>a</sup>

Dades com a mitjana  $\pm$  SD

- BLÁZQUEZ, M.; CARRILLO, M.; ZANUY, S.; PIFERRER, F. (1999). «Sex ratios in offspring of sex-reversed sea bass and the relationship between growth and phenotypic sex differentiation». *J. Fish Biol.*, 55:916-930.
- KITANO, T.; TAKAMUNE, K.; KOBAYASHI, T.; NAGAHAMA, Y.; ABE, S. I. (1999). «Suppression of P450 aromatase gene expression in sex-reversed males produced by rearing genetically female larvae at high water temperature during a period of sex differentiation in the Japanese flounder *Paralichthys olivaceus*». *J. Mol. Endocrinol.*, 23:167-176.
- KOUMOUNDOUROS, G.; PAVLIDIS, M.; ANEZAKI, L.; KOKKARI, C.; STERIOTI, A.; DIVANACH, P.; KENTOURI, M. (2002). «Temperature sex determination in the European sea bass, *Dicentrarchus labrax* (L., 1758) (Teleostei, Perciformes, Moronidae): critical sensitive ontogenetic phase». *J. Exp. Zool.*, 292:573-579.
- PAVLIDIS, M.; KOUMOUNDOUROS, G.; STERIOTI, A.; SOMARAKIS, S.; DIVANACH, P.; KENTOURI, M. (2000). «Evidence of temperature-dependent sex determination in the European sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.)». *J. Exp. Zool.*, 276:209-218.
- ROBLIN, C.; BRUSLÉ, J. (1983). «Ontogenèse gonadique et différenciation sexuelle du loup *Dicentrarchus labrax*, en conditions d'élevage». *Reprod. Nutr. Dévelop.*, 23:115-127.
- SAILLANT, E.; FOSTIER, A.; HAFFRAY, P.; MENU, B.; THIMONIER, J.; CHATAIN, B. (2002). «Temperature effects and genotype-temperature interactions on sex determination in the European sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.)». *J. Exp. Zool.*, 292:494-505.
- SAILLANT, E.; CHATAIN, B.; MENU, B.; FAUVEL, C.; VIDAL, M. O.; FOSTIER, A. (2003). «Sexual differentiation and juvenile intersexuality in the European sea bass (*Dicentrarchus labrax*)». *J. Zool. Lond.*, 260:53-63.
- UCHIDA, D.; YAMASHITA, M.; KITANO, T.; IGUCHI, T. (2004). «An aromatase inhibitor or high water temperature induce oocyte apoptosis and depletion of P450 aromatase activity in the gonads of genetic female zebrafish during sex-reversal». *Comp. Biochem. Physiol.*, 137:11-20.