



UNIVERSIDAD DE LAS PALMAS  
DE GRAN CANARIA

UNIVERSIDAD DE LAS PALMAS DE GRAN CANARIA

FACULTAD DE VETERINARIA

DEPARTAMENTO DE PATOLOGÍA ANIMAL, PRODUCCIÓN ANIMAL, BROMATOLOGÍA  
Y TECNOLOGÍA DE LOS ALIMENTOS

**TESIS DOCTORAL**

“MEJORA GENÉTICA EN DORADA (*Sparus auratus* L.):  
ESTIMACIÓN DE PARÁMETROS GENÉTICOS DE CARACTERES  
DE CRECIMIENTO Y CALIDAD”

Ana Navarro y Guerra del Río

Arucas 2008





UNIVERSIDAD DE LAS PALMAS  
DE GRAN CANARIA

UNIVERSIDAD DE LAS PALMAS DE GRAN CANARIA  
FACULTAD DE VETERINARIA

DEPARTAMENTO DE PATOLOGÍA ANIMAL, PRODUCCIÓN ANIMAL, BROMATOLOGÍA  
Y TECNOLOGÍA DE LOS ALIMENTOS

PROGRAMA DE DOCTORADO CLÍNICA Y TERAPÉUTICA

Tesis Doctoral presentada por **Dña. Ana Navarro y Guerra del Río**

Dirigida por **El Doctor D. Juan Manuel Afonso López**  
**La Doctora Dña. M<sup>a</sup> Jesús Zamorano Serrano**

El Director

La Directora

La Doctoranda

Juan Manuel  
Afonso  
López

M<sup>a</sup> Jesús  
Serrano  
Zamorano

Ana  
Navarro y  
Guerra del Río

Arucas 2008





UNIVERSIDAD DE LAS PALMAS DE GRAN CANARIA  
Departamento de Patología Animal, Producción Animal  
Bromatología y Tecnología de los Alimentos

---

**Juan Manuel Afonso López**, Profesor Titular de Universidad del departamento de Patología Animal, Producción Animal, Bromatología y Tecnología de los Alimentos de la Universidad de Las Palmas de Gran Canaria,

**María Jesús Zamorano Serrano**, Profesora Contratada Doctora de Universidad del departamento de Patología Animal, Producción Animal, Bromatología y Tecnología de los Alimentos de la Universidad de Las Palmas de Gran Canaria,

**INFORMAN:**

Que Ana Navarro y Guerra del Río, Licenciada en Ciencias Biológicas, ha realizado bajo nuestra dirección y asesoramiento, el presente trabajo titulado **MEJORA GENÉTICA EN DORADA (*Sparus auratus* L.): ESTIMACIÓN DE PARÁMETROS GENÉTICOS DE CARACTERES DE CRECIMIENTO Y CALIDAD**, el cual consideramos reúne las condiciones y la calidad científica para optar al grado de Doctora.

En Arucas, a día 16 de diciembre de 2008.

Fdo.: Juan Manuel Afonso López

Fdo.: María Jesús Zamorano Serrano



*A mi madre, mi padre,  
mis hermanas, mis hermanos  
y a mi... Borja*





## AGRADECIMIENTOS

---

*Es difícil citar aquí a todas las personas que en estos siete años me han ayudado, de una manera u otra, a sacar este trabajo adelante, a todas ellas mi más sincera gratitud. Pero no puedo dejar de destacar a aquellas que más directamente me han brindado su apoyo.*

*A mi director y mi directora de tesis por haberme dado la oportunidad de realizar este trabajo, por haberme guiado todos estos años y por su amistad. Gracias Juanma por tu esfuerzo y dedicación, incluso cuando estabas cansado o muy apurado de tiempo; por haberme transmitido tu optimismo y entusiasmo y por esos debates, cuando escribíamos los artículos, en los que disfruté y aprendí mucho. Gracias María Jesús por tu ayuda y consejo siempre que lo necesité, por tu cercanía y empatía, y por dirigir el trabajo de laboratorio desde un punto de vista realista.*

*A Rafa, por su apoyo, su amistad y por ser mi maestro “de calidad”. Gracias por dar ese toque de despreocupación y practicidad en el trabajo, y por enseñarme cual es “el secreto del éxito”...*

*A todos mis compañeros y compañeras que año tras año han pasado por este laboratorio, por los momentos compartidos. En especial a Maite, Víctor, Nico, Silvia, Vicky, Mohamed, Davinia y Laura con los que además he compartido una amistad. Gracias por su apoyo y por haberme hecho disfrutar dentro y fuera del laboratorio. A Silvia, otra vez, porque fue mi primera maestra en el laboratorio y también con ella he firmado mis últimos artículos. Gracias por iniciarme en las PCRs con tu rigurosidad y disciplina, por ayudarme en infinidad de cosas y por tu eficaz “Silvia responde”.*

*A las personas que me proporcionaron un ambiente agradable de trabajo en la facultad de veterinaria. Al personal de laboratorio por su ayuda, disponibilidad y actitud. Gracias Manola, Eduardo, Mayeya e Irene. De una manera especial a Manola por su amistad y sus ganas de aprender y de trabajar sin importarle el qué, el cómo y el cuándo. A ti, te dedico la portada, ya sabes el porqué. A Ricardo por su eficacia y sus ganas de resolver los problemas. A Lita, Tata y Ángela por su colaboración siempre que la necesité y su sonrisa diaria. A Irma, Yoli, Paco, Carmelo y Araña, porque siempre me pusieron facilidades, incluso a horas intempestivas. A los vecinos del*

## **Agradecimientos**

---

laboratorio de parásitos, Sergio, Yeray y Antonio, por alegrarme los días, gracias y... ¡hasta el lunes!

Al personal de cultivos del I.C.C.M, Ada, Moneiba y Manolo, por su ayuda en la cría de los peces y porque hicieron más entretenidas mis estancias en la nave. A Javi Ro por proporcionarme los peces y por sus consejos para la cría de éstos. Gracias a todas las personas del IUSA con las que compartí aparatos, comidas y demás momentos, y en especial a Carmen por su ayuda y su indiscutible capacidad de organización.

A Pilu, Sara y Samuel por su ayuda y simpatía, por haberme soportado todos estos años y por tratarme tan bien a pesar de haberles robado numerosos momentos familiares.

A la Biopeña, MariValle, Marta, MariFrancis, David, Jairo, Dácil, Iván, Amadeo, Zule, Antonio, Carmelo, Montse, Borja, Sara y Laura, por su amistad y porque a pesar de la distancia y el tiempo, siempre han estado presentes. Nunca olvidaré aquellos encuentros en Bodegas Álvaro. ¡Muchas gracias!

A todas las jugadoras del Unión Navarro F.S. que han pasado por el equipo en estos años por haberme proporcionado la posibilidad de desconectarme del trabajo y hacer deporte, al mismo tiempo que disfrutar. Gracias a Lucía, MariPino, Mariajo, Carmen, Oti, Ana Marta, Mika, Katarata, Maijo, Kenty, Rosalva, Silvia, Jenni, Judit, Ire, Yaya, Amelia y Mai, que además de compañeras han sido y son mis amigas. ¡Unión Navarro, se dijo!

A mi padre Fernando y mi madre Otilia, por haberme transmitido su optimismo, paciencia y vivir el presente, tan necesarios en ciencia y en la vida, además de darme su apoyo espiritual y material. A mis hermanos y hermanas Lucía, María, Quique, Cristián, Tana, Nico, Carmen, Rafa, Caye, Marta, Ale, Oti y Fernando, a mis sobrinos y sobrinas y a mis cuñadas y cuñados; por su colaboración en determinados aspectos de mi tesis, por haberme animado y aconsejado, por los innumerables “gratos momentos” pero sobre todo por estar conmigo siempre. Siento haberme perdido eventos familiares y espero tener más tiempo a partir de ahora. A mi tía Fifi, por su ayuda con el material y su cariño. ¡Gracias familia!

A Borja por el amor que nos une, por su inestimable ayuda, por compartir conmigo todos esos pequeños triunfos que te da una tesis, por soportarme y consolarme en los momentos difíciles y por animarme y empujarme para que no abandonara. Gracias por haber estado conmigo, sabes que sin ti, no lo hubiera logrado.

Por último, y no por eso menos importante, quisiera agradecer a la empresa Tinamenor S.A. el haberme cedido las aletas de sus reproductores, a la empresa Playa de Vargas 2001 S.L. por haberme dado la oportunidad de engordar peces en sus instalaciones y a la Universidad de Las Palmas de Gran Canaria por haber financiado mi tesis con una beca predoctoral.



# ÍNDICE GENERAL

---

|  |    |
|--|----|
| RESUMEN.....   | 1  |
| 1. INTRODUCCIÓN GENERAL.....   | 5  |
| 1.1. DESCRIPCIÓN Y CARACTERÍSTICAS BIOLÓGICAS DE DORADA.....   | 7  |
| 1.2. SITUACIÓN ACTUAL DEL CULTIVO DE DORADA.....   | 9  |
| 1.3. JUSTIFICACIÓN DEL TRABAJO .....   | 12 |
| 2. EVALUACIÓN DEL SISTEMA DE MARCAJE PIT ( <i>Passive Integrated Transponder</i> ) EN ALEVINES DE DORADA ( <i>Sparus auratus</i> L.).....                  | 17 |
| 2.1. INTRODUCCIÓN.....   | 19 |
| 2.2. MATERIALES Y MÉTODOS .....  | 22 |
| 2.2.1. PROTOCOLO DE MARCAJE .....  | 22 |
| 2.2.2. EXPERIMENTO 1 .....   | 25 |
| 2.2.3. EXPERIMENTO 2.....  | 26 |
| 2.2.4. EXPERIMENTO 3.....  | 26 |
| 2.2.5. ANÁLISIS DE PATÓGENOS.....  | 27 |
| 2.2.6. ANÁLISIS DE LOS DATOS .....   | 28 |
| 2.3. RESULTADOS.....   | 30 |
| 2.3.1. CRECIMIENTO, MORTALIDAD Y TASA DE PÉRDIDA DEL PIT, DENTRO DE EXPERIMENTOS.....  | 30 |
| Experimento 1:.....  | 30 |
| Experimento 2:.....  | 31 |
| Experimento 3:.....  | 33 |
| 2.3.2. TASAS DE MORTALIDAD Y DE PÉRDIDA DEL PIT ENTRE EXPERIMENTOS.....  | 35 |
| 2.3.3. VELOCIDAD DE MARCAJE Y TIEMPO DE CICATRIZACIÓN .....  | 36 |
| 2.4. DISCUSIÓN .....   | 37 |
| 3. DESARROLLO DE DOS NUEVAS PCR MÚLTIPLEX PARA DOS ESPECIES DE ESPÁRIDOS: DORADA ( <i>Sparus auratus</i> L.) Y SAMA ROQUERA ( <i>Pagrus auriga</i> ) ..... | 43 |
| 3.1. INTRODUCCIÓN.....   | 45 |
| 3.2. MATERIALES Y MÉTODOS .....  | 48 |

|   |     |
|---|-----|
| 3.2.1. MUESTRAS .....   | 48  |
| 3.2.2. PCR MULTIPLEX.....   | 49  |
| <i>Rediseño de cebadores:</i> .....   | 49  |
| <i>Condiciones de PCR:</i> .....  | 53  |
| <i>Condiciones de la carrera:</i> .....   | 54  |
| 3.2.3. ANÁLISIS DE LOS DATOS.....   | 55  |
| 3.3. RESULTADOS.....  | 57  |
| 3.4. DISCUSIÓN.....   | 64  |
| 4. ESTIMAS DE HEREDABILIDADES, CORRELACIONES GENÉTICAS, E INTERACCIÓN GX A, BAJO CONDICIONES INDUSTRIALES, PARA CARACTERES DE CRECIMIENTO, DE LA CANAL Y DE CALIDAD EN DORADA ( <i>Sparus auratus</i> L.) ..... | 71  |
| 4.1. INTRODUCCIÓN .....   | 73  |
| 4.2. MATERIALES Y MÉTODOS.....  | 77  |
| 4.2.1. MATERIAL BIOLÓGICO .....   | 77  |
| 4.2.2. CARACTERES ANALIZADOS.....   | 79  |
| <i>Caracteres de crecimiento:</i> .....   | 79  |
| <i>Caracteres de la canal:</i> .....  | 79  |
| <i>Caracteres de calidad:</i> .....   | 80  |
| 4.2.3. GENOTIPADO Y ASIGNACIÓN PARENTAL.....  | 83  |
| 4.2.4. ANÁLISIS DE LOS DATOS.....   | 83  |
| 4.3. RESULTADOS .....   | 86  |
| 4.3.1. GENOTIPADO Y ASIGNACIÓN PARENTAL.....  | 86  |
| 4.3.2. RESULTADOS FENOTÍPICOS .....   | 86  |
| <i>Caracteres de crecimiento y de la canal:</i> .....   | 86  |
| <i>Caracteres de calidad:</i> .....   | 89  |
| 4.3.3. HEREDABILIDADES Y CORRELACIONES .....  | 90  |
| 4.3.4. INTERACCIÓN GENOTIPO X AMBIENTE.....   | 94  |
| 4.4. DISCUSIÓN.....   | 95  |
| 4.4.1. GENOTIPADO Y ASIGNACIÓN PARENTAL.....  | 95  |
| 4.4.2. RESULTADOS FENOTÍPICOS .....   | 96  |
| <i>Caracteres de crecimiento y de la canal:</i> .....   | 96  |
| <i>Caracteres de calidad:</i> .....   | 97  |
| 4.4.3. HEREDABILIDADES Y CORRELACIONES .....  | 98  |
| <i>Caracteres de crecimiento y de la canal:</i> .....   | 98  |
| <i>Caracteres de calidad:</i> .....   | 104 |
| 4.4.4. INTERACCIÓN GENOTIPO X AMBIENTE (GXA) .....  | 108 |

|  |     |
|--|-----|
| 5. CONCLUSIONES .....  | 111 |
| 6. BIBLIOGRAFÍA .....  | 117 |
| ANEXO I - PROTOCOLOS .....   | 139 |
| 1. EXTRACCIÓN DE ADN A PARTIR DE ALETA .....                       | 139 |
| 2. DETERMINACIÓN DE LA CANTIDAD DE HUMEDAD DEL FILETE.....         | 142 |
| 3. DETERMINACIÓN DE LA CANTIDAD DE CENIZAS DEL FILETE .....        | 143 |
| 4. DETERMINACIÓN DE LA CANTIDAD DE GRASA DEL FILETE .....          | 144 |
| 5. DETERMINACIÓN DE LA CANTIDAD DE HIDROXIPROLINA DEL FILETE ..... | 146 |
| ANEXO II - ARTÍCULOS.....  | 149 |
| 1. NAVARRO <i>et al.</i> , 2006 .....                              | 151 |
| 2. NAVARRO <i>et al.</i> , 2008 .....                              | 159 |
| 3. NAVARRO <i>et al.</i> , 2009 .....                              | 167 |
| 4. NAVARRO <i>et al.</i> (enviado).....                            | 185 |

## ÍNDICE DE FIGURAS

---

|  |    |
|--|----|
| Figura 1: Visión lateral de una dorada adulta .....  | 7  |
| Figura 2: Evolución de producción de dorada de acuicultura en Europa para el periodo 1996-2007 y previsión para 2008 (APROMAR, 2008).....  | 10 |
| Figura 3: Distribución porcentual de las producciones de dorada por comunidad autónoma española en 2007 (APROMAR, 2008).....   | 11 |
| Figura 4: Radiografías de alevines de dorada marcados con PIT. A: marcaje en cavidad abdominal (PIT-A), bajo la vejiga natatoria. B: marcaje en el músculo del lomo dorsal (PIT-M). .....  | 23 |
| Figura 5: Marcas visibles en el pez tras el marcaje. Incisiones del PIT: Cada incisión previa a la inserción del PIT, tanto en el lomo (PIT-M) como en la cavidad abdominal (PIT-A). VIE-lomo: Localización del elastómero del sistema de marcaje VIE en los peces control. VIE-cola: Localización del elastómero del sistema de marcaje VIE en los peces marcados con PIT (PIT-A en el lado izquierdo y PIT-M en el derecho). ..... | 24 |
| Figura 6: Gel de agarosa al 1% cargado con muestras de ADN. Pocillo 1: marcador de peso molecular Lambda <i>Hind III</i> ; pocillos 2-7: Muestras de ADN íntegro; pocillo 8: Muestra de ADN degradado. ....  | 49 |
| Figura 7: Gel de agarosa al 2% cargado con reacciones de RimA en dorada. Pocillo 1: marcador de peso molecular <i>pGEM3Z</i> cortado con <i>Hin FI</i> ; pocillo 2: Amplificación a partir de ADN degradado; pocillos 3-7: amplificaciones correctas; pocillo 8: control negativo. ....  | 55 |
| Figura 8: Morfología de los alelos de cada marcador microsatélite de ambas múltiplex en dorada. A: Múltiplex RimA. B: Múltiplex RimB.....  | 58 |
| Figura 9: Morfología de los alelos de cada marcador microsatélite de ambas múltiplex en sama roquera. A: Múltiplex RimA. B: Múltiplex RimB. ..   | 59 |



Figura 10: Instalaciones de engorde de los peces. A: Empresa Playa de Vargas 2001 S.L., con jaulas. B: Instituto Canario de Ciencias Marinas, con tanques.....77

Figura 11: Soxhlet utilizado para extraer la grasa del filete mediante lavados con éter de petróleo.....81

Figura 12: Reacción colorimétrica de la hidroxiprolina previa medición en el espectrofotómetro. En la gradilla los estándares y en la placa las muestras y los estándares. ....82

## ÍNDICE DE TABLAS

---

|  |    |
|--|----|
| Tabla 1: Experimento-1: Número de peces utilizados (N), pesos iniciales, medios y finales (media±error típico), tasas de pérdida del PIT y tasas de mortalidad. ....   | 31 |
| Tabla 2: Experimento-2: Número de peces utilizados (N), pesos iniciales, medios y finales (media±error típico), tasas de crecimiento diario, tasas de pérdida del PIT y tasas de mortalidad. ....  | 32 |
| Tabla 3: Experimento-2: Número de peces utilizados (N), tasas de pérdida del PIT y tasas de mortalidad, agrupados por rango de pesos y sólo considerando los peces marcados (PIT-A).....   | 33 |
| Tabla 4: Experimento-3: Número de peces utilizados (N), pesos iniciales, medios y finales (media±error típico), tasas de pérdida del PIT y tasas de mortalidad. ....   | 34 |
| Tabla 5: Nombre del locus, fluorocromo y secuencias de los cebadores rediseñados y referencia de cada marcador microsatélite.....  | 50 |
| Tabla 6: Concentración final de los cebadores de cada marcador microsatélite (µM), en ambas reacciones múltiplex, para dorada y sama roquera. ....   | 52 |
| Tabla 7: Volumen y concentración de cada componente en la reacción de PCR, en ambas múltiplex, en un volumen final de 12,5 µl. ....  | 53 |
| Tabla 8: Número y rango de tamaño de los alelos, heterocigocidad observada (H.O.) y esperada (H.E.) y probabilidad de exclusión (P.E.) de cada uno de los marcadores microsatélites de ambas múltiplex en dorada. Así como la Probabilidad de exclusión combinada a priori (P.E.C.) y el porcentaje real de asignación parental (P.R.A.), estimados de manera acumulada (*), es decir, añadiendo un marcador más cada vez..... | 61 |
| Tabla 9: Número y rango de tamaño de los alelos, heterocigocidad observada (H.O.) y esperada (H.E.) y probabilidad de exclusión (P.E.) de cada uno de los marcadores microsatélites de ambas múltiplex en sama roquera 62  |    |

Tabla 10: Peso, longitud forquial, compacidad (media  $\pm$  error típico) y sus coeficientes de variación (CV) a diferentes edades (días post-hatching) de doradas engordadas en las instalaciones del Instituto Canario de Ciencias Marinas. ....87

Tabla 11: Resultados fenotípicos y coeficientes de variación (CV) de las variables de crecimiento, de la canal y de calidad (media  $\pm$  error típico), al sacrificio (509 días de edad), de doradas engordadas en las dos estaciones (valores de cada estación y la media total). ....88

Tabla 12: Repetibilidad y coeficientes de variación entre réplicas para cada variable de composición de la carne. ....90

Tabla 13: Correlaciones fenotípicas (encima de la diagonal) y correlaciones genéticas (en cursiva debajo de la diagonal, con  $\pm$  error típico) entre peso, longitud (Long) y compacidad (FC) para dorada a diferentes edades. En la diagonal y en negrita las heredabilidades con  $\pm$  error típico. ....92

Tabla 14: Correlaciones fenotípicas (encima de la diagonal) y correlaciones genéticas (en cursiva debajo de la diagonal, con  $\pm$  error típico) entre caracteres de crecimiento, de la canal y de calidad, para dorada a talla comercial (509 días de edad). En la diagonal y en negrita las heredabilidades con  $\pm$  error típico. ....93

Tabla 15: Interacciones genotipo  $\times$  ambiente (p valor) y correlaciones genéticas entre las dos estaciones ( $\pm$  error típico) para cada carácter, en dorada a talla comercial (509 días de edad). ....94



## RESUMEN

---

En este estudio se han estimado, por primera vez para dorada (*Sparus auratus* L.), parámetros genéticos para caracteres de crecimiento, de la canal y de calidad, bajo condiciones industriales de cultivo, para lo que se han desarrollado las herramientas necesarias como la implementación del sistema de marcaje físico *Passive Integrated Transponder* (PIT) y de reacciones múltiplex de marcadores microsatélites.

Para poner a punto el sistema de marcaje PIT, se realizaron tres experimentos en alevines de dorada. Se evaluaron dos posiciones donde insertar el PIT y cuatro tallas de marcaje, valorando la tasa de pérdida del PIT y el efecto de éste sobre la mortalidad y el crecimiento de los peces. Se determinó que la mejor ubicación es la cavidad abdominal del pez y que los peces a partir de los 3 gramos pueden ser marcados sin que el sistema de marcaje afecte significativamente a la mortalidad ni al crecimiento de los mismos. Además, presenta una tasa de pérdida baja que puede disminuir con la experiencia de la persona que marca. A partir de los 4 gramos, la tasa de pérdida es cero, independientemente de la experiencia. Por todo esto el sistema de marcaje PIT es una herramienta útil a la hora de implantar un programa de mejora genética de dorada que posibilita la trazabilidad de los peces desde una edad muy temprana.

Se desarrollaron y evaluaron dos PCR múltiplex de marcadores microsatélites, llamadas RimA y RimB (*Redesigned Interspecific Multiplex*), en dos especies de espáridos: dorada y sama roquera (*Pagrus auriga*, Valenciennes, 1843), a partir de 27 marcadores interespecíficos con cebadores rediseñados. La cantidad de marcadores que al final constituyeron la RimA y la RimB en cada

especie fue de 10 y 7 en dorada y de 8 y 5 en sama roquera. Se estimó el polimorfismo de ambas múltiplex en las dos especies, y además, en dorada, se valoró la eficacia de las mismas en la determinación de relaciones familiares entre descendientes y los reproductores de un lote industrial, la cual fue de un 100%. En este sentido, la RimA y la RimB, aportan a las empresas una herramienta factible y eficaz, bajo condiciones industriales, para la reconstrucción de la genealogía de los peces, la cual es una condición necesaria en un programa de mejora genética.

Por último, doradas descendientes de un lote de industrial de reproductores de la empresa Tinamenor, se criaron en Gran Canaria, desde la talla de alevín hasta la talla comercial, en dos sistemas de producción: jaulas y tanques, de la empresa Playa de Vargas 2001 S.L. y del Instituto Canario de Ciencias Marinas (ICCM), respectivamente. Los peces engordados en estas últimas instalaciones fueron marcados con el sistema PIT desde el inicio del engorde y muestreados cada mes. A talla comercial se sacrificaron todos los peces de ambas estaciones y se analizaron caracteres de crecimiento, de la canal y de calidad. Sólo utilizando la RimA, cada uno de los descendientes analizados fueron asignados a un solo padre y a una sola madre. Se estimaron parámetros genéticos (heredabilidades y correlaciones) al sacrificio para caracteres de crecimiento, de la canal y de calidad, y a tres edades del desarrollo para caracteres de crecimiento. Entre edades, las estimas de heredabilidad variaron entre 0,28 y 0,34 para el peso, de 0,27 a 0,35 para la longitud y de 0,05 a 0,13 para la compacidad. Las similares heredabilidades del peso y la longitud junto con las altas correlaciones genéticas entre ambos caracteres en todas las edades, revelan que son criterios igualmente válidos para la selección, si bien se propone la longitud por ser un carácter más fácil de medir y más repetible. Las correlaciones

genéticas para los mismos caracteres entre edades cercanas fueron muy altas pero decrecieron conforme eran estimadas entre edades distantes, sugiriendo que no sería apropiada una selección en fases tempranas del desarrollo de dorada. A talla de sacrificio, donde se utilizaron los peces de ambas instalaciones, las estimas de heredabilidad estuvieron alrededor de 0,34 para el peso y la longitud, de 0,13 para la compacidad y entre estos dos valores para los caracteres de la canal (rendimiento filete, rendimiento canal, peso filete y peso canal). El valor más alto se obtuvo para el porcentaje de grasa visceral (0,50) y los más bajos (0,02- 0,09) para los caracteres de composición de la carne (grasa muscular, humedad, ceniza y colágeno), por lo que parece difícil cambiar estos últimos caracteres mediante estrategias genéticas. Las correlaciones genéticas pusieron de manifiesto que en dorada los caracteres de peso de la canal y del filete pueden ser mejorados indirectamente a través de la longitud. Sin embargo, la correlación genética negativa entre ésta y el rendimiento filete, sugiere que a largo plazo debe vigilarse el rendimiento filete en peces de alto crecimiento. Además, la correlación genética alta y negativa entre el rendimiento canal y la grasa visceral, junto con la alta heredabilidad de ésta última, indica que la inclusión de dicho carácter dentro de un programa de selección de dorada permitiría disminuir la grasa visceral a la vez que aumentar el rendimiento cárnico. Por otro lado, se estimaron valores no significativos de interacción genotipo x ambiente entre las dos estaciones para todos los caracteres.

Todos estos resultados revelan el potencial que tienen las empresas de dorada para mejorar su producción no sólo mediante el manejo, sino también a través de la explotación de la variación genética aditiva, y ponen de manifiesto que es posible implementar un programa de mejora genética en dorada, sin cambiar la idiosincrasia de la industria.







## 1. INTRODUCCIÓN GENERAL



## 1. INTRODUCCIÓN GENERAL

---

### **1.1. Descripción y características biológicas de dorada.**

La dorada es una especie de agua salada, perteneciente a la familia de los espáridos y al género *Sparus* (*Sparus auratus*, Linnaeus, 1758). Se caracteriza por tener una forma corporal oval, alta, especialmente en la parte anterior, y aplanada lateralmente. El perfil de la cabeza es convexo, sus ojos son pequeños, preopérculo desnudo y labios anchos. Su cuerpo es de coloración gris plateada con irisaciones doradas que se extienden lateralmente desde la zona anterior a la zona caudal del pez. Aleta caudal ahorquillada. Muestra una característica banda dorada entre los ojos y una mancha oscura al comienzo de la línea lateral, que cubre también la parte superior del hueso opercular (Figura 1).



**Figura 1:** Visión lateral de una dorada adulta

En cuanto a su distribución geográfica, se encuentra por las costas orientales del océano Atlántico, desde Gran Bretaña hasta Cabo Verde, y por todo el mar Mediterráneo. Debido a sus hábitos eurihalinos y euritérmicos, esta especie habita zonas litorales en ambientes marinos, lagunas costeras y zonas de estuarios, en particular durante las primeras fases del ciclo de vida. Como consecuencia de estos hábitos, las doradas hacen una migración trófica, nacen en el mar en invierno, posteriormente los juveniles migran a principios de primavera en busca de lugares más protegidos, con abundancia de comida y unas temperaturas medias. Regresando a mar abierto a finales de otoño para reproducirse (Moretti *et al.*, 1999).

En lo referente a su dieta natural, es preferentemente carnívora, depredadora de especies de fondo (bivalvo y gasterópodo), crustáceos y pequeños peces. En general, se considera una especie de crecimiento rápido en la naturaleza, alcanzando los 300 g en el segundo año y aproximadamente los 600 g en el tercero, pudiendo llegar a tener un tamaño de 70 cm y un peso de 5 Kg (Castelló, 1993).

Por otro lado, es una especie hermafrodita proterándrica, primero madura como macho y a partir del segundo o tercer año se convierte en hembra. Su estación reproductiva tiene lugar durante un periodo más o menos extenso, bajo días cortos y decrecientes, ya sea de octubre a diciembre en el Mediterráneo Occidental (Arias, 1980) o un poco más tarde, entre noviembre y febrero, en el Mediterráneo Oriental (Ben-tuvia, 1979).

Los huevos de dorada son planctónicos, esféricos y transparentes, de 1 mm de diámetro aproximado y con una o varias gotas de aceite en su interior, pudiendo producirse cantidades variables que fluctúan entre 500.000 y 6.000.000 de huevos, por kilo de hembra (Cejas *et al.*, 1992).

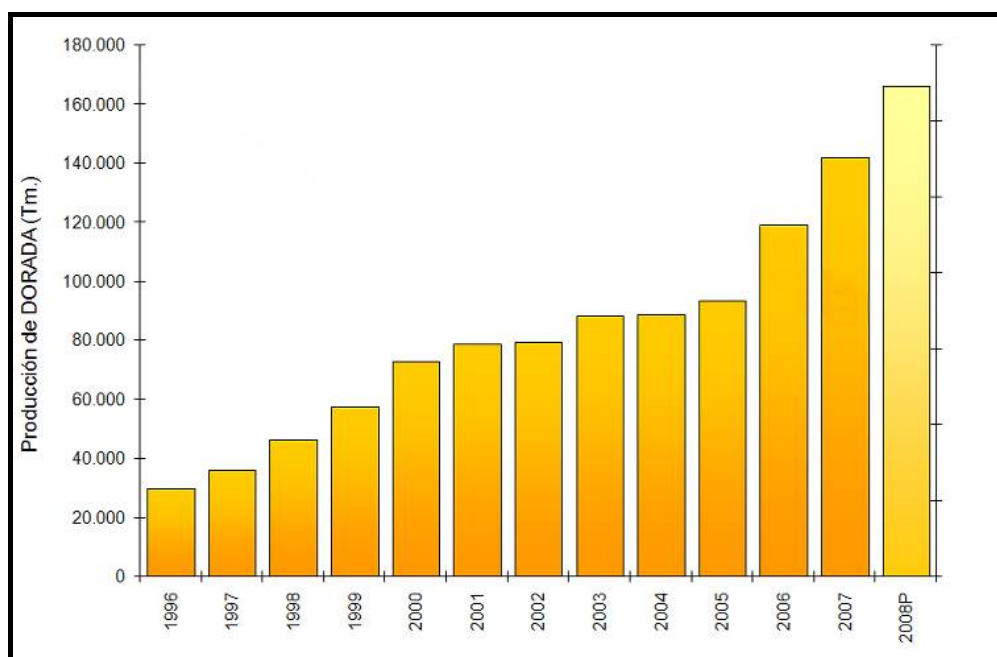
El nacimiento se produce en aguas de época invernal, normalmente los peces migran hacia las aguas costeras protegidas en busca de alimento abundante y temperaturas más suaves (Migración Tropical). Se trata de una especie muy sensible a las bajas temperaturas (letal por debajo de los 4° C). A finales de otoño vuelven a migrar a mar abierto donde se produce la cría de los peces adultos.

### **1.2. Situación actual del cultivo de dorada**

En 2006 se produjeron sólo 26,4 millones de toneladas menos de productos de acuicultura en el mundo, frente a la pesca extractiva. La producción global de la acuicultura ha crecido de manera significativa, pasando de 0,6 millones de toneladas en 1950 a 66,7 millones de toneladas en 2006, con un valor comercial que sobrepasó los 67 millones de euros y previéndose que continúe su expansión alcanzando los 100 millones de toneladas en 2030 (APROMAR, 2008).

La producción de la acuicultura europea es líder en el mundo en algunas especies como el salmón Atlántico (*Salmo salar*), la trucha común (*Salmo trutta*), la lubina (*Dicentrarchus labrax*), el rodaballo (*Psetta maxima*), el mejillón (*Mytilus edulis*) y la dorada; es más, la producción intensiva de peces marinos en los países del entorno mediterráneo está en plena expansión, siendo la dorada la especie

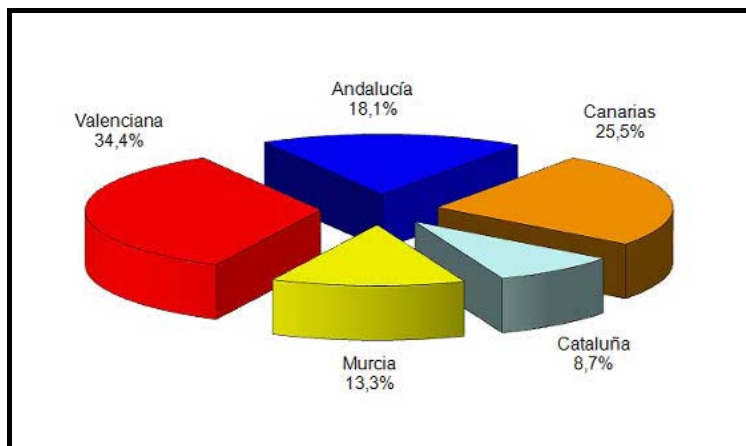
más importante y mayormente responsable de este auge al verse sus producciones incrementadas desde 40.000 toneladas en 1997 a casi 152.000 toneladas en 2007 (Figura 2).



**Figura 2:** Evolución de producción de dorada de acuicultura en Europa para el periodo 1996-2007 y previsión para 2008 (APROMAR, 2008).

El cultivo intensivo de dorada dejó de ser experimental a partir de 1989, para convertirse en un proceso industrial que ha permitido que esta especie sea un producto asequible y con una continuidad durante todo el año, de hecho, aunque actualmente se siga descargando en los puertos pesqueros dorada procedente de la pesca extractiva, la dorada de crianza supone el 95% del total. Los principales países productores de dorada y responsables de este aumento en la producción son Grecia (52,9%), Turquía (15,9%), España (14,8%) e Italia (5,9%).

Así, la producción acuícola de dorada en España en 2007, de la que Canarias es la segunda comunidad autónoma en orden de producción (Figura 3), ha sido de 22.320 toneladas, un 10,4% más que en 2006 (APROMAR, 2008). Toda esta producción es llevada a cabo, fundamentalmente, en jaulas flotantes aunque también son utilizados sistemas de engorde en esteros o instalaciones en tierra (tanques).



**Figura 3:** Distribución porcentual de las producciones de dorada por comunidad autónoma española en 2007 (APROMAR, 2008)

El crecimiento y consolidación de la industria de dorada ha venido acompañada por un aumento de la competitividad de las empresas por minimizar costes y/o dar un valor añadido a su producto. Todo esto hace que el conocimiento científico y la innovación tecnológica dirigida a la optimización de los ciclos de cultivo de esta especie, adquiera especial relevancia en el mantenimiento de sus niveles de producción, principalmente sobre aspectos de nutrición y reproducción y seguidamente sobre aspectos genéticos.

### **1.3. Justificación del trabajo**

Los resultados de los programas de mejora genética en especies animales domésticas son muy notables, alcanzándose tasas anuales de progreso genético del orden del 1-3% de la media. Aunque la tasa de progreso genético pueda parecer pequeña en relación con las atribuibles a los avances conseguidos en nutrición o manejo, debe tenerse en cuenta que, a diferencia de estos últimos, la ganancia genética es continua, acumulativa y permanente (López-Fanjul y Toro, 2007). A pesar de que las estrategias genéticas en acuicultura no son abundantes, actualmente han sido implantados con éxito programas de mejora genética en salmónidos, ciprínidos, tilapia y pez gato (Gjedrem, 1997; Gjedrem y Thodesen, 2005). Sin embargo, en dorada han sido muy escasas las estrategias genéticas sobre los núcleos de reproductores y descendientes, y la industria optimiza su producción a través de factores de manejo como la alimentación, la cría, la reproducción o la prevención de enfermedades. Esto es debido en parte, al alto costo que supone para las empresas organizar su producción con criterios genéticos, a las características biológicas de la dorada, al desconocimiento de la determinación genética de los caracteres y a la falta de metodología que conjugue los intereses de producción con la explotación de la variación genética de éstos. Para poder implementar un programa de mejora genética en dorada sería necesario, tener en cuenta las condiciones industriales e intereses de producción en cada una de sus fases como son la determinación de la matriz de parentesco, la definición de los caracteres objeto de la selección, la estima de parámetros genéticos y la cuantificación de la interacción genotipo x ambiente (GxA).



La dorada es una especie que permite el establecimiento de cruces individuales viables (Knibb *et al.*, 1998; Montero *et al.*, 2001), sin embargo su implantación dentro del contexto de la industria presenta muchos problemas debido a que magnifica los costes de producción en términos de recursos humanos e infraestructura. Esto, unido a la imposibilidad de normalizar la fecundación *in vitro* mediante la obtención de esperma y óvulos por masaje abdominal, hace que la estrategia más extendida para garantizar las necesidades de mercado y costes de producción en las empresas sean las puestas masales, a partir de lotes de reproductores constituidos por un elevado número de peces, entre 40 y 60 animales aproximadamente. Desde el punto de vista genético, esta estrategia presenta la ventaja de que minimiza las fuentes de parecido por ambiente común entre los miembros de la misma familia (Herbinger *et al.*, 1999), lo que proporciona precisión en las estimas, pero también presenta el inconveniente de que imposibilita conocer la genealogía de los peces, que es un requisito indispensable para estimar parámetros genéticos. Por consiguiente, en especies con este tipo de producciones, para determinar las relaciones familiares de los peces, requeridas en un programa de mejora, es necesaria la conjunción de marcadores físicos y moleculares (Wesmajervi *et al.*, 2006).

El sistema de marcaje físico e individual de los peces es de gran utilidad para el reconocimiento de los mismos a lo largo de la cría y el engorde. Además, es importante su implementación desde estadios tempranos del desarrollo con el fin de posibilitar el reconocimiento de la genealogía a lo largo de la producción y permitir así estimas de correlaciones genéticas y toma de decisiones en la elaboración de índices de selección para la evaluación genética de los peces. El sistema *Passive Implant Transponder* (PIT) ha sido ampliamente utilizado en peces por tener poco o ningún efecto sobre el crecimiento y la supervivencia de éstos

(Prentice *et al.*, 1989). Sin embargo, para su implementación en esquemas de selección genética es necesaria su optimización en cada especie, debido a las distintas características biológicas. En dorada no existen estudios de marcadores físicos del sistema PIT, y menos aun a tallas pequeñas, con el fin de minimizar las fuentes de parecido debido al ambiente común que sufren los peces provenientes de distintos lotes de reproductores, cuando estos son criados de manera separada a lo largo del desarrollo.

Por otro lado, los marcadores moleculares como los microsatélites han sido ampliamente utilizados para reconstruir las relaciones familiares en diferentes especies de peces, tanto en poblaciones de cultivo como en poblaciones naturales (Chistiakov *et al.*, 2006), a través de su conjugación con paquetes bioinformáticos (Fernández y Toro, 2006). Sin embargo, su implementación a nivel industrial, constituye un obstáculo para las empresas debido al alto coste económico, ya que, entre otras causas, el genotipado de los peces es llevado a cabo normalmente de manera individual para cada marcador. En este sentido, el desarrollo de PCR múltiplex son de gran utilidad ya que permiten reducir los costes económicos por reacción y optimizar los análisis de reconstrucción de genealogía y variabilidad genética de las poblaciones de cultivo (Neff *et al.*, 2000; Wesmajervi *et al.*, 2006). Sin embargo, en dorada no existen reacciones múltiplex con un número adecuado de marcadores que sea eficaz bajo condicionantes de producción.

Todo esto ha dado lugar a que no existan prácticamente estimas de parámetros genéticos en dorada, salvo las de heredabilidad realizadas llevadas a cabo por Knibb *et al.* (1997) para el peso al sacrificio, la heredabilidad para el cortisol plasmático post-estrés de confinamiento mediante cruces familiares por

Montero *et al.* (2001), y la estimada, a escala experimental, para las deformidades de lordosis y opérculo, por Castro *et al.* (2008). A pesar de ello, la industria de dorada está interesada en caracteres que son comunes para la mayoría de las especies de peces bajo explotación comercial, ya que los programas de mejora genética en piscicultura comparten una serie de objetivos de selección, entre los que se incluyen tanto los que influyen sobre el beneficio comercial como los que determinan el coste de producción, así como aquellos que condicionan las preferencias del consumidor. En este sentido, en acuicultura suelen tenerse en cuenta el crecimiento, la edad a la madurez sexual, la resistencia a enfermedades y la calidad del pez y de la carne (López-Fanjul y Toro, 2007).

Al mismo tiempo, el sistema de producción de dorada presenta claras diferencias ambientales. Los alevines son preengordados y engordados fundamentalmente en jaulas situadas en el Mar Mediterráneo o en el océano Atlántico, y en coordenadas geográficas muy diferentes, como es el caso de Canarias donde las temperaturas son más elevadas y estables a lo largo de todo el año frente al Mediterráneo. Sin embargo, también se engordan alevines de dorada con el sistema de esteros o tanques en tierra, propio del sur de España. Todas estas variaciones existentes en los sistemas de producción y la localización de las instalaciones de dorada imprimen resultados muy dispares a los diferentes caracteres de interés para los piscicultores. Por lo que es de utilidad estimar las interacciones GxA, ya que si éstas existen, pueden limitar o incluso perjudicar el progreso genético (Saillant *et al.*, 2006; Dupont-Nivet *et al.*, 2008).

Teniendo en cuenta todo esto, el objetivo del presente estudio es estimar por primera vez para dorada, y bajo condiciones industriales, heredabilidades, correlaciones genéticas e interacciones GxA, para aquellos caracteres de interés

económico para las empresas, a partir de peces criados en dos sistemas de producción diferentes (jaulas y tanques) y descendientes de un lote de reproductores industrial. A la vez que se pretenden desarrollar las herramientas necesarias para estimar estos parámetros genéticos, que permitan respetar la idiosincrasia del sistema de producción que utiliza la industria para esta especie, como son el sistema de marcaje físico PIT y reacciones de PCR múltiplex robustas.



## 2. EVALUACIÓN DEL SISTEMA DE MARCAJE PIT (PASSIVE INTEGRATED TRANSPONDER) EN ALEVINES DE DORADA (*Sparus auratus* L.).

---

A. Navarro, V. Oliva, J.M. Zamorano, R. Ginés, M.S. Izquierdo, N. Astorga, J.M. Afonso, 2006. Evaluation of PIT system as a method to tag fingerling of gilthead seabream (*Sparus auratus* L.): effects on growth, mortality and tag loss. **Aquaculture** 257, 309-315.

A. Navarro, V. Oliva, M.J. Zamorano, R. Ginés, N. Astorga, J.M. Afonso, 2004. Evaluation of passive integrated transponder tag for tagging juvenile gilthead seabream (*Sparus auratus* L.); effects on growth, mortality and tag loss. **Aquaculture Europe'04**. Octubre 2004, Barcelona.

A. Navarro, V. Oliva, M.J. Zamorano, R. Ginés, J.M. Afonso, 2004. Evaluación del sistema de marcaje pit (*passive integrated transponder*) en alevines de dorada (*Sparus auratus* L.). **ITEA** 100, 141-145. **XII Reunión Nacional de Mejora Genética Animal**. Julio 2004, Arucas, Las Palmas.



## 2.1. INTRODUCCIÓN

---

Para el marcaje individual de los peces, habitualmente se utilizan sistemas físicos externos e internos. Los sistemas de marcaje externos tienen las ventajas de ser económicos, fáciles de aplicar y no requerir tecnología sofisticada (Mofett *et al.*, 1997), sin embargo presentan la desventaja de que pueden afectar al crecimiento, a la salud y supervivencia de los peces (Berg y Berg, 1990; Bergman *et al.*, 1992; Mofett *et al.*, 1997). Por el contrario, los sistemas internos, como el *Passive Integrated Transponder* (PIT), tienen poco o ningún efecto sobre el crecimiento y la supervivencia de los peces (Prentice *et al.*, 1989; Quartararo y Bell, 1992; Baras *et al.*, 1999, 2000; Gries y Letcher, 2002; Bateman y Gresswell, 2006; Acolas *et al.*, 2007), y su marcaje no afecta en el nivel de cortisol, que es un parámetro de medida del estrés de los peces (Feldhaus *et al.*, 2008).

El sistema de marcaje PIT permite el reconocimiento individual de los peces. Está constituido por un circuito integrado y una antena en espiral la cual transmite la información identificativa que tiene codificada, proporcionando un número, inducida por una unidad de lectura (Landolt, 1989; Roussel *et al.*, 2000).

Las diferencias biológicas entre las especies, en susceptibilidad a los anestésicos y la manipulación, la capacidad de recuperación, la tasa de crecimiento o incluso la morfología entre las especies, hace necesario que el sistema de marcaje PIT deba ser optimizado para cada especie. En este sentido, existen trabajos en salmónidos como salmón rojo (*Oncorhynchus nerka*) (Prentice *et al.*, 1989), salmón del Atlántico (*Salmo sala*) (Roussel *et al.*, 2000; Gries y Letcher, 2002), salmón chinook (*Oncorhynchus tshawytscha*) (Dare 2003), trucha arcoiris

(*Oncorhynchus mykiss*) (Bateman y Gresswell, 2006) y trucha común (*Salmo trutta*) (Acolas *et al.*, 2007), percas como la perca dorada (*Macquaria ambigua*) (Ingram, 1994) y europea (*Perca fluviatilis*) (Baras *et al.* 2000), tilapia del Nilo (*Oreochromis niloticus*) (Baras *et al.*, 1999), carpa asiática (*Labeo rohita*) (Mahapatra *et al.*, 2001), cavilat (*Cottus gobio*) (Bruyndoncx *et al.*, 2002) y en espáridos como la dorada australiana (*Pagrus auratus*) (Quartararo y Bell, 1992) y el bocinegro (*Pagrus pagrus*) (Soula *et al.*, 2009). Sin embargo, no existen estudios de marcaje individual en dorada (*Sparus auratus* L.) y menos aún a tallas pequeñas, a pesar de ser una especie muy importante dentro de la acuicultura mediterránea.

Teniendo en cuenta todo esto, en el presente estudio se realizaron tres experimentos consecutivos para la puesta a punto del sistema de marcaje *Passive Integrated Transponder* (PIT) en alevines de dorada, con los siguientes objetivos concretos:

→ Determinar la mejor ubicación física del PIT, evaluando su tasa de pérdida y su efecto sobre el crecimiento y la mortalidad del pez.

→ Determinar la talla mínima de marcaje con PIT, en doradas de dos a ocho gramos, evaluando su tasa de pérdida y su efecto sobre el crecimiento y la mortalidad del pez.

→ Determinar el efecto de la experiencia de la persona que marca con PIT, evaluando su tasa de pérdida y su efecto sobre el crecimiento y la mortalidad del pez, en doradas de tres a cuatro gramos.



→ Determinar el efecto de la experiencia de la persona que marca con PIT, evaluando su tasa de pérdida y su efecto sobre el crecimiento y la mortalidad del pez, en doradas superiores a los cuatro gramos.

→ Determinar la velocidad de marcaje con PIT.

→ Determinar el tiempo de cicatrización de la herida ocasionada por la inserción del PIT.

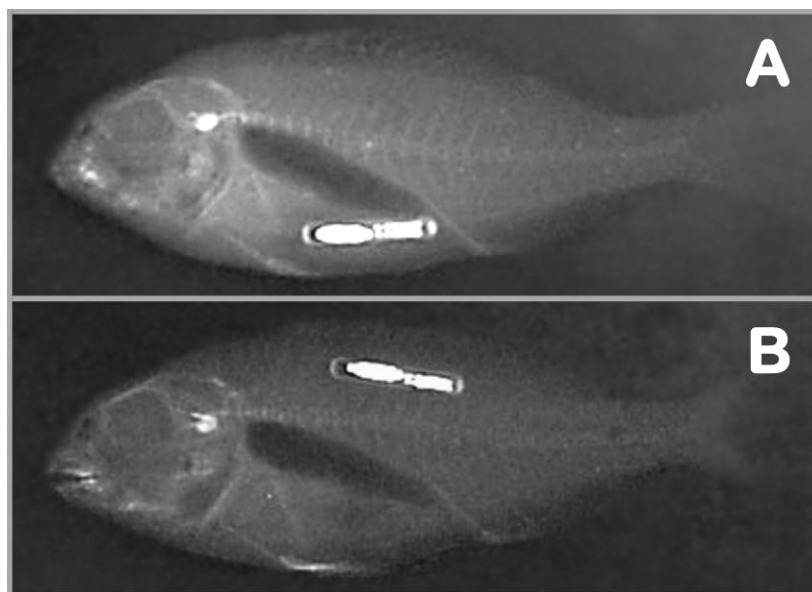
## 2.2. MATERIALES Y MÉTODOS

---

En el presente estudio se realizaron tres experimentos que fueron llevados a cabo en el departamento de cultivos marinos del Instituto Canario de Ciencias Marinas (Islas Canarias, España).

### ***2.2.1. Protocolo de marcaje***

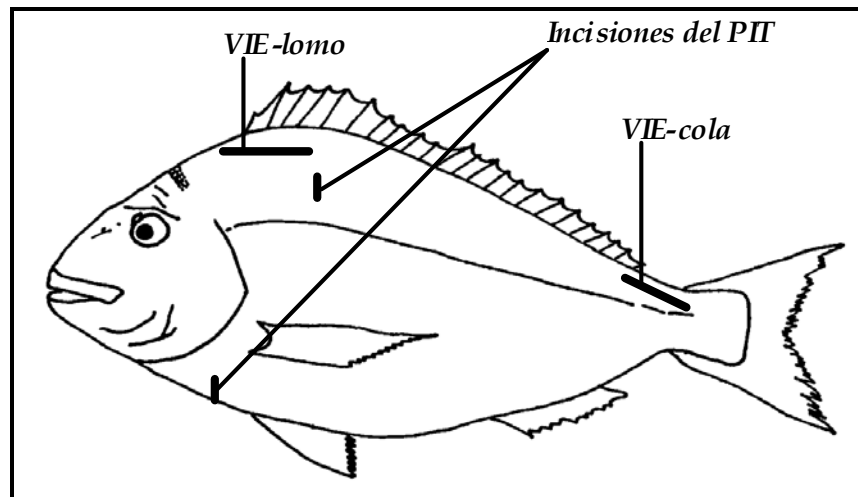
En los tres experimentos se utilizaron PIT de la empresa TROVAN Ltd. (Reino Unido), de 2,05 mm diámetro, 11 mm de largo y 0,096 g de peso, previamente sumergidos en alcohol, los cuales se detectaron usando el lector ARE H5 de la misma empresa. Se utilizaron dos ubicaciones para el implante del PIT: la cavidad abdominal (Figura 4a) y el músculo del lomo dorsal (Figura 4b), denominadas como PIT-A y PIT-M respectivamente, a lo largo del texto. En el caso de los peces PIT-A, el PIT se introdujo a través del espacio comprendido entre las aletas pélvicas y el maxilar inferior, por ser menos sensible al desgarro. En ambas ubicaciones, el PIT se introdujo siempre en posición horizontal, es decir paralelo al eje del pez, mediante una jeringa, haciendo previamente una pequeña incisión de 2,7 mm de diámetro (Figura 5) con el bisel de una aguja y aplicando después un poco de yodo en la herida.



**Figura 4:** Radiografías de alevines de dorada marcados con PIT. **A:** marcaje en cavidad abdominal (PIT-A), bajo la vejiga natatoria. **B:** marcaje en el músculo del lomo dorsal (PIT-M).

Para evaluar el marcaje, se compararon los peces marcados con PIT con peces no marcados o controles (C). Debido a que los peces marcados y los controles se criaron en el mismo tanque, para poder asignar correctamente las tasas de mortalidad y de pérdida del PIT a cada grupo de peces (PIT-A, PIT-M y C), éstos fueron distinguidos mediante marcaje con el sistema *Visible Implant Elastomer* (VIE; Northwest Marine Technology, Shaw Island Washington, EE.UU.), el cual es un marcador físico interno, consistente en un elastómero fluorescente que se inyecta de manera subcutánea en el tejido. Para dicho marcaje se siguieron las recomendaciones del proveedor y de Astorga *et al.* (2005). Estos autores describieron para dorada que el sistema VIE no tiene efecto ni en la supervivencia ni en el crecimiento, que la tasa de retención es del 100% y que la mejor visibilidad se obtiene con el color rojo y en la orientación horizontal. Por

tanto, usando siempre el elastómero rojo en esa orientación, los peces PIT-A fueron marcados además con el sistema VIE en el lado izquierdo del pez por la zona caudal, los peces PIT-M fueron marcados en la misma zona por el lado derecho, y los peces control, en el lomo por el lado izquierdo (Figura 5).



**Figura 5:** Marcas visibles en el pez tras el marcaje. **Incisiones del PIT:** Cada incisión previa a la inserción del PIT, tanto en el lomo (PIT-M) como en la cavidad abdominal (PIT-A). **VIE-lomo:** Localización del elastómero del sistema de marcaje VIE en los peces control. **VIE-cola:** Localización del elastómero del sistema de marcaje VIE en los peces marcados con PIT (PIT-A en el lado izquierdo y PIT-M en el derecho).

Antes del marcaje, todos los peces fueron anestesiados con clorobutanol (200 mg/l), seguidamente fueron marcados con el sistema VIE y luego con el sistema PIT, excepto los controles. Posteriormente, los peces fueron mantenidos en un tanque de 100 litros con aireación y renovación de agua, hasta su total

recuperación, momento en el que fueron transferidos a los tanques de experimentación.

### **2.2.2. Experimento 1**

El objetivo de este primer experimento fue determinar la mejor posición corporal para implantar el PIT a talla pequeña. Para ello se comparó la posición de la cavidad abdominal (PIT-A) y la posición del músculo dorsal (PIT-M), evaluando la tasa de pérdida del PIT y su efecto sobre el crecimiento y la mortalidad del pez, considerando como referencia peces no marcados con PIT.

Se utilizaron 103 peces con un peso medio inicial ( $\pm$  error típico) de  $3,45 \pm 0,03$  g. De éstos, 36 peces fueron marcados en una posición (PIT-A), y otros 33 peces fueron marcados en otra (PIT-M). Los restantes 34 peces se dejaron sin marcar (C o control). Todos los peces fueron distribuidos al azar, en igual proporción (PIT-A, PIT-M y C), en dos tanques de 500 litros, con el objetivo de que todos los peces estuviesen sometidos a las mismas condiciones de cultivo. Los peces se mantuvieron durante un periodo total de 26 días y alimentados según las tablas de alimentación recomendadas por la empresa suministradora de piensos Proaqua S.A. (Dueñas, Palencia). La densidad media inicial fue de  $0,36 \pm 0,01$  kg/m<sup>3</sup>, y el oxígeno disuelto, la temperatura y el flujo del agua fueron de  $6,42 \pm 0,08$  ppm,  $19,84 \pm 0,07$  °C y 4 l/min., respectivamente. Se realizaron tres muestreos en los que se pesaron y midieron los peces, a los días 0, 15 y 26.

### **2.2.3. Experimento 2.**

El objetivo de este segundo experimento fue determinar la talla mínima de dorada para implantar el PIT, utilizando la ubicación idónea obtenida en el primer experimento. Para ello se compararon peces de pesos comprendidos entre los 2 a los 8 g, evaluando la tasa de pérdida del PIT y su efecto sobre el crecimiento y la mortalidad del pez, considerando como referencia peces no marcados.

Se utilizaron 908 peces con un peso medio de  $4,63 \pm 0,04$  g, de los cuales 668 fueron marcados con en la posición PIT-A y los restantes 240 peces se dejaron sin marcar (C o control). Ambas clases de peces fueron distribuidas al azar y en igual proporción en dos tanques de 1000 litros y mantenidos con las condiciones de alimentación recomendadas por la empresa suministradora de piensos Proaqua S.A. (Dueñas, Palencia) durante un periodo de 66 días. La densidad media inicial fue de  $2,26 \pm 0,08$  kg/m<sup>3</sup> y el oxígeno disuelto, la temperatura y el flujo del agua fueron de  $6,21 \pm 0,08$  ppm,  $22,46 \pm 0,06$  °C y 21 l/min., respectivamente. El peso y la longitud de los peces se midieron los días 0, 36 y 66 del experimento.

### **2.2.4. Experimento 3.**

El objetivo de este tercer experimento fue evaluar el efecto de la experiencia de la persona que marca sobre la tasa de pérdida del PIT y la

mortalidad del pez, a tallas superiores a los 4 gramos, comparando dichos datos con los del segundo experimento.

Se utilizaron 282 peces cuyos pesos, con una media de  $6,24\pm 0,07$  g, estaban comprendidos entre los 4 y 9 gramos. De éstos, 102 peces se marcaron en la posición PIT-A y los restantes 180 se utilizaron como control (C). Ambos grupos de peces fueron distribuidos al azar y en igual proporción en tres tanques de 1000 litros y mantenidos con las condiciones de alimentación recomendadas por la empresa suministradora de piensos Proaqua S.A. (Dueñas, Palencia) durante un periodo de 58 días. La densidad media inicial fue de  $0,59\pm 0,01$  kg/m<sup>3</sup> y el oxígeno disuelto, la temperatura y el flujo del agua fueron de  $6,61\pm 0,11$  ppm,  $20,97\pm 0,12$  °C y 22 l/min., respectivamente. Los peces se pesaron y se midieron los días 0, 30 y 58 del experimento.

### ***2.2.5. Análisis de patógenos***

Todos los peces marcados con PIT que murieron durante los tres experimentos se analizaron para determinar la presencia o no, de organismos infecciosos (*Vibrio spp.* y *Photobacterium spp.*) que ya han sido descritos en las Islas Canarias (Deniz *et al.*, 1993; Real *et al.*, 1997). Para ello se sembraron de cada pez muestras de riñón, hígado, bazo y tejido de la herida producida por la inserción del PIT y se realizaron las pruebas de los citados patógenos siguiendo el método de Austin y Austin (1999). Estos análisis se realizaron en el laboratorio de Ictiopatología y Enfermedades Infecciosas de la facultad de Veterinaria de la Universidad de Las Palmas de Gran Canaria.

### **2.2.6. Análisis de los datos**

El crecimiento de los peces fue evaluada mediante la tasa específica de crecimiento diario (SGR; *Specific Growth Rate*), la cual fue calculada como sigue:

$$\text{SGR (\%)} = (\text{Ln PF} - \text{Ln PI}) 100 / \Delta T$$

Donde *PF* y *PI* son los pesos finales e iniciales respectivamente, y  $\Delta T$  el intervalo de tiempo comprendido entre los puntos de medición de ambos pesos.

Los datos de peso y crecimiento, previamente comprobada su normalidad y su homogeneidad de varianzas, se analizaron mediante una ANOVA de dos vías utilizando el programa SPSS (v 13.0) (SPSS, Chicago, IL, EE.UU.) aplicando el siguiente modelo lineal general:

$$Y_{ijk} = \mu + \alpha_i + \beta_j + (\alpha\beta)_{ij} + \varepsilon_{ijk}$$

Donde *Y* es el dato del pez,  $\mu$  es la media global,  $\alpha_i$  el efecto fijo del sistema de marcaje,  $\beta_j$  el efecto fijo del tanque,  $(\alpha\beta)_{ij}$  la interacción entre ambos factores y  $\varepsilon_{ijk}$  el error residual.

La tasa de mortalidad de los peces y la tasa de pérdida del PIT, se expresaron como porcentajes y se analizaron mediante el siguiente modelo loglineal usando el programa SPSS (v 13.0):

$$\ln f_{ij} = \mu + \alpha_i + \beta_j + \alpha\beta_{ij}$$



Donde,  $ln f_{ij}$  = es la frecuencia esperada de la celda  $ij$ ,  $\mu$  = es la media de los logaritmos de las frecuencias esperadas,  $\alpha_i$  = es el efecto de la categoría  $i$ -ésima del factor tasa de mortalidad ó tasa de pérdida,  $\beta_j$  = es el efecto de la categoría  $j$ -ésima del factor posición de marcaje o rango de pesos y  $\alpha\beta_{ij}$  = es el efecto debido a la interacción de ambos factores.

El análisis loglineal permite la detección de asociaciones estadísticamente significativas entre variables cualitativas, y discernir la responsabilidad estadística entre las celdas, mediante sus valores tipificados (Z).

### ***2.3.1. Crecimiento, mortalidad y tasa de pérdida del PIT, dentro de experimentos.***

#### ***Experimento 1:***

En este experimento no se encontró efecto sobre el crecimiento del sistema de marcaje PIT en ninguna de las dos ubicaciones corporales (Tabla 1). Al inicio del experimento los pesos medios de los peces marcados y no marcados no fueron estadísticamente diferentes ( $3,45 \pm 0,04$  g para PIT-A,  $3,46 \pm 0,06$  g para PIT-M y  $3,44 \pm 0,05$  g para C) ( $P > 0,05$ ), estando todos comprendidos entre los 3 y los 4 gramos. Al final de experimento, los peces marcados en el músculo del lomo dorsal presentaron un peso ligeramente superior al resto de los peces pero sin diferencias estadísticamente significativas ( $6,02 \pm 0,20$  g para PIT-A,  $6,46 \pm 0,26$  g para PIT-M y  $6,11 \pm 0,16$  g para C) ( $P > 0,05$ ). A la edad intermedia de 15 días, los peces marcados experimentaron una pérdida de peso respecto a los peces control, siendo significativamente diferente sólo los peces PIT-A ( $4,66 \pm 0,12$  g,  $4,98 \pm 0,14$  g y  $5,25 \pm 0,15$  g para PIT-A, PIT-M y C, respectivamente) ( $P < 0,05$ ). En cuanto a la longitud, estuvo correlacionada significativamente con el peso ( $0,72$ ;  $P < 0,001$ ) y no hubo diferencias significativas ni al inicio ni al final del experimento ( $P > 0,05$ ).

En la Tabla 1 se muestran los valores obtenidos de tasas de pérdida del PIT y tasas de mortalidad de los peces, obtenidas a lo largo de todo el experimento, de manera acumulada. Respecto a la tasa de pérdida, se

encontraron diferencias estadísticamente significativas entre las dos ubicaciones del PIT ( $P < 0,05$ ), siendo el valor de los peces PIT-A (14%) más bajo que el de los peces PIT-M (40%). Sin embargo, la tasa de mortalidad fue muy baja en los tres grupos y no fue estadísticamente diferente entre ellos ( $P > 0,05$ ).

**Tabla 1:** Experimento-1: Número de peces utilizados (N), pesos iniciales, medios y finales (media±error típico), tasas de pérdida del PIT y tasas de mortalidad.

| Marcaje | N  | Peso medio inicial (g) | Peso medio a día 15 (g) | Peso medio final (g) | Tasa de pérdida (%) | Tasa de mortalidad (%) |
|---------|----|------------------------|-------------------------|----------------------|---------------------|------------------------|
| PIT-A   | 36 | 3,45±0,04              | 4,66±0,12 <sup>a</sup>  | 6,02±0,20            | 14 <sup>a</sup>     | 2,8                    |
| PIT-M   | 33 | 3,46±0,06              | 4,98±0,14 <sup>b</sup>  | 6,46±0,26            | 40 <sup>b</sup>     | 0                      |
| Control | 34 | 3,44±0,05              | 5,25±0,15 <sup>b</sup>  | 6,11±0,16            | -                   | 0                      |

PIT-A: Peces marcados con PIT en la posición de la cavidad abdominal. PIT-M: Peces marcados con PIT en la posición del músculo del lomo dorsal. Control: Peces no marcados. Los valores en cada columna que muestran diferente letra como superíndice son significativamente distintos ( $P < 0,05$ ).

### **Experimento 2:**

Al inicio del experimento hubo diferencias significativas entre los peces marcados PIT-A (4,78±0,04 g) y no marcados o control (4,47±0,07 g) ( $P < 0,05$ ), lo cual se mantuvo hasta el final del experimento (39,39±0,31 g y 37,65±0,50 g para PIT-A y C, respectivamente) ( $P < 0,05$ ), poniendo de relieve la no existencia de efecto del sistema de marcaje PIT sobre el crecimiento, de hecho, la tasa específica de crecimiento diaria (SGR) fue la misma en peces marcados (PIT-A) y control, 3.2% ( $P > 0,05$ ). Dichas diferencias significativas en peso, se mantuvieron también

a la edad intermedia de 36 días ( $20,45 \pm 0,17$  g y  $19,30 \pm 0,28$  g para PIT-A y C, respectivamente) ( $P < 0,05$ ). Con respecto a la longitud, ésta estuvo correlacionada con el peso de manera estadísticamente significativa ( $0,97$ ;  $P < 0,001$ ) (Tabla 2).

**Tabla 2:** Experimento-2: Número de peces utilizados (N), pesos iniciales, medios y finales (media $\pm$ error típico), tasas de crecimiento diario, tasas de pérdida del PIT y tasas de mortalidad.

| Marcaje | N   | Peso medio inicial (g) | Peso medio a día 30 (g) | Peso medio final (g) | SGR (%) | Tasa de pérdida (%) | Tasa de mortal. (%) |
|---------|-----|------------------------|-------------------------|----------------------|---------|---------------------|---------------------|
| PIT-A   | 668 | $4,78 \pm 0,04^a$      | $20,45 \pm 0,17^a$      | $39,39 \pm 0,31^a$   | 3,2     | 1,7                 | 3,4                 |
| Control | 240 | $4,47 \pm 0,07^b$      | $19,30 \pm 0,28^b$      | $37,65 \pm 0,50^b$   | 3,2     | -                   | 2,1                 |
| Total   | 908 | $4,63 \pm 0,04$        | $19,87 \pm 0,16$        | $38,52 \pm 0,29$     | 3,2     | -                   | 3,1                 |

PIT-A: Peces marcados con PIT en la posición de la cavidad abdominal. PIT-M: Peces marcados con PIT en la posición del músculo del lomo dorsal. Control: Peces no marcados. SGR: Tasa específica de crecimiento diario. Los valores en cada columna que muestran diferente letra como superíndice son significativamente distintos ( $P < 0,05$ ).

La tasa acumulada de pérdida de los PITs en los peces marcados fue baja (1,7%) y estuvo asociada significativamente con el peso de los peces. Ya que agrupando los peces por talla, aquellos con pesos comprendidos entre 2 y 3 gramos fueron los responsables de dicha significación, puesto que presentaron la mayor tasa de pérdida del PIT, con un valor del 8,6% ( $Z_{2-3}$  g, con PIT perdido = +3,0;  $P < 0,05$ ) (Tabla 3). En cuanto a la tasa de mortalidad de los peces durante todo el experimento, ésta fue muy similar entre los peces PIT-A (3,4%) y los peces control (2,1%), sin diferencia estadística significativa entre ambos valores

( $P > 0,05$ ) (Tabla 2). Sin embargo, dentro de los peces marcados con PIT, hubo diferencias significativas de mortalidad agrupando los peces por talla. Así, los peces con pesos comprendidos entre 2 y 3 gramos fueron lo que mostraron una mortalidad mayor, estadísticamente significativa, del 14,3% ( $Z_{2-3 \text{ g, muertos}} = +3,32$ ;  $P < 0,05$ ) (Tabla 3).

**Tabla 3:** Experimento-2: Número de peces utilizados (N), tasas de pérdida del PIT y tasas de mortalidad, agrupados por rango de pesos y sólo considerando los peces marcados (PIT-A).

| Rango de pesos | N   | Tasa de pérdida (%) | Tasa de mortalidad (%) |
|----------------|-----|---------------------|------------------------|
| 2 - 3 g        | 35  | 8,6 <sup>a</sup>    | 14,3 <sup>a</sup>      |
| 3 - 4 g        | 145 | 2,8 <sup>b</sup>    | 3,4 <sup>b</sup>       |
| 4 - 5 g        | 239 | 0,8 <sup>b</sup>    | 2,5 <sup>b</sup>       |
| 5 - 8 g        | 249 | 0,8 <sup>b</sup>    | 2,8 <sup>b</sup>       |

Los valores en cada columna que muestran diferente letra como superíndice son significativamente distintos ( $P < 0,05$ ).

### ***Experimento 3:***

En este experimento el peso medio inicial de todos los peces fue de  $6,24 \pm 0,07$  g, sin encontrarse diferencias significativas entre los peces PIT-A ( $6,26 \pm 0,12$  g) y los peces control ( $6,23 \pm 0,09$  g) ( $P > 0,05$ ). A las edades de 30 y 58 días tampoco hubo diferencias significativas entre estos grupos de peces. Siendo los pesos medios para la edad de 30 días de  $12,48 \pm 0,23$  g para PIT-A y

12,54±0,18 g para C ( $P>0,05$ ), y al final del experimento (edad de 58 días) ligeramente superior el peso de C (28,46±0,38 g) frente a los peces PIT-A (27,56±0,51 g) ( $P>0,05$ ) (Tabla 4). La correlación entre el peso y la longitud fue siempre elevada y significativa estadísticamente (0,97;  $P<0,001$ ) en todos los puntos de muestreo.

**Tabla 4:** Experimento-3: Número de peces utilizados (N), pesos iniciales, medios y finales (media±error típico), tasas de pérdida del PIT y tasas de mortalidad.

| Marcaje | N   | Peso medio inicial (g) | Peso medio a día 30 (g) | Peso medio final (g) | Tasa de pérdida (%) | Tasa de mortalidad (%) |
|---------|-----|------------------------|-------------------------|----------------------|---------------------|------------------------|
| PIT-A   | 102 | 6,26±0,12              | 12,48±0,23              | 27,56±0,51           | 0                   | 0                      |
| Control | 180 | 6,23±0,09              | 12,54±0,18              | 28,46±0,38           | -                   | 1,2                    |
| Total   | 282 | 6,24±0,07              | 12,51±0,15              | 28,01±0,32           | -                   | 1,0                    |

PIT-A: Peces marcados con PIT en la posición de la cavidad abdominal. Control: peces no marcados.

En la Tabla 4 se muestran los valores obtenidos de tasas acumuladas de pérdida del PIT y de mortalidad de los peces. En relación a la tasa de pérdida, ésta fue mínima durante todo el periodo de experimentación (0%) ya que todos los peces marcados retuvieron el PIT. Por otro lado, la tasa de mortalidad fue muy baja para todos los peces, mostrando un 1% de media (0% y 1,2% para los peces PIT-A y C, respectivamente).

### **2.3.2. Tasas de mortalidad y de pérdida del PIT entre experimentos**

Todos los peces muertos se analizaron para detectar organismos infecciosos (*Vibrio spp.* y *Photobacterium spp.*), determinándose que la mortalidad no estuvo nunca asociada a patologías infecciosas. En los tres experimentos, nunca hubo diferencias estadísticas significativas entre peces marcados y no marcados dentro de cada experimento para las tasas de mortalidad acumulada a lo largo de todo el período de experimentación, si bien es en la primera semana cuando se produce una mayor incidencia de ésta, obteniéndose un 35% en el segundo experimento, indicando que el manejo fue el factor responsable de las mortalidades. La comparación de los tres experimentos, considerando sólo los peces PIT-A, puso de manifiesto una disminución no significativa de la tasa de mortalidad corregida respecto a los peces no marcados, a medida que aumentó la talla de los peces, mostrando que la implantación del PIT no produce ninguna mortalidad adicional a la propia del cultivo de la especie, para peces de peso superior a los 3 gramos, obteniéndose una mortalidad del 2,8% en el primer experimento, del 1,3% en el segundo y del 0% en el tercero, no estadísticamente distintas ( $P > 0,05$ ). Sin embargo, para los peces con pesos entre 2 y 3 gramos si existe un efecto significativo del marcaje con PIT sobre la supervivencia de los peces, como se observó en el segundo experimento (Tabla 3).

La comparación de la tasa de pérdida del PIT entre los tres experimentos, considerando sólo los peces PIT-A, mostró una relación inversa y estadísticamente significativa con la talla de los peces marcados, la cual fue debida sólo al exceso de tasa de pérdida en el primer experimento

( $Z_{\text{experimento-1, con PIT perdido}} = +3,42$ ;  $P < 0,05$ ) (Tablas 1, 2, y 4). Esta significación está claramente influenciada por la experiencia del marcador, la cual aumentó del primer al tercer experimento. En este sentido, a la talla más pequeña, de entre 3 a 4 gramos, la tasa de pérdida disminuyó un 11,2% entre el primero y segundo experimento por un exceso de tasa de pérdida en el que se realizó primero ( $Z_{\text{experimento-1, con PIT perdido}} = +4,3$ ;  $P < 0,05$ ). Por el contrario, para los peces de entre 4 y 8 gramos, no hubo diferencias estadísticamente significativas entre el segundo y el tercer experimento.

### ***2.3.3. Velocidad de marcaje y tiempo de cicatrización***

La velocidad media de marcaje (PIT-A) obtenida durante los tres experimentos, fue de 19 segundos por pez. En este tiempo se incluyó: coger el pez, hacer la incisión, introducir el PIT, aplicar yodo en la herida y depositar el pez en el tanque de recuperación.

El tiempo requerido para la cicatrización de la herida provocada por la inserción del PIT en la cavidad abdominal, durante los tres experimentos, fue de aproximadamente 20 días. Sin embargo, ya a los 15 días se encontraron peces con la incisión completamente restaurada y a partir de los 26 días, no se apreció la cicatriz de la herida en ninguno de los peces marcados.



## 2.4. DISCUSIÓN

---

De las dos ubicaciones para el PIT valoradas en este estudio, para peces comprendidos entre los 3 y 4 gramos (5 y 8 cm), el marcaje en la cavidad abdominal (PIT-A) mostró una tasa de pérdida del PIT, un 26% menor que el marcaje en lomo dorsal (PIT-M). Sin embargo, no se encontraron diferencias significativas para las tasas de mortalidad y de crecimiento, entre los peces PIT-A, PIT-M y los no marcados. Ingram (1994) no encontró diferencias en cuanto a la tasa de pérdida del PIT, en percas doradas de 32 a 51 cm de longitud, entre peces marcados en lomo dorsal y peces marcados en la cavidad abdominal, la cual fue cero en ambos casos. Posiblemente, esto fue debido a la alta talla de marcaje, puesto que en doradas y lubinas (*Dicentrarchus labrax* L.) de aproximadamente 200 gramos y 21 cm de longitud, que marcamos también en ambas zonas, se obtuvo una ausencia de pérdida del PIT (datos no mostrados). A pesar de que al final de los experimentos no hubo diferencia en crecimiento entre peces marcados y no marcados, a talla pequeña, los peces PIT-A mostraron un menor crecimiento durante las dos primeras semanas, posiblemente debido a la opresión que ejerce el PIT sobre el sistema digestivo del pez, produciéndose con posterioridad un crecimiento compensatorio. Baras *et al.* (1999 y 2000), Bateman y Gresswell (2006) y Soula *et al.* (2009), en tilapia del Nilo, perca europea, trucha arcoiris y bocinegro, respectivamente, también observaron a corto plazo, un menor crecimiento de los peces marcados frente a los peces no marcados, el cual fue compensado posteriormente durante el desarrollo de los peces.

El marcaje interno con PIT es un sistema rápido que permite el reconocimiento individual de los peces. La minimización del tiempo de marcaje depende de la experiencia y habilidad de la persona que aplica la marca, el tamaño del pez, la dureza del tejido y la realización o no de incisión previa. Baras *et al.* (1999) utilizaron para marcar tilapia del Nilo de entre 3 y 7 gramos, anestesiadas y con incisión previa, 40 segundos por pez (90 peces por hora). Baras *et al.* (2000) requirieron de 60 segundos por pez (60 peces por hora), para marcar perca europea de 5,1 gramos de media, también anestesiadas e incluyendo incisión previa. Gries y Letcher (2002) necesitaron de entre 36 a 45 segundos por pez (unos 80 ó 100 peces por hora) para marcar salmón del Atlántico de 22,5 gramos incluyendo la incisión previa. En el presente estudio sólo se necesitaron 19 segundos por pez para marcar doradas anestesiadas de entre 3 a 9 gramos (189 peces por hora), posiblemente debido a que, para realizar la incisión previa, no se utilizó escalpelo sino una aguja con el bisel bien afilado. También puede existir algún efecto de la especie, ya que por ejemplo en tilapia del Nilo, Baras *et al.* (1999) mencionan que después de la incisión y antes de introducir el PIT, era necesario retirar suavemente las escamas descolocadas.

La mayor mortalidad debida al uso del sistema físico interno PIT se produce aproximadamente durante los diez primeros días después de realizar el implante (Baras *et al.*, 1999, 2000; Gries y Letcher, 2002; Dare, 2003; Bateman y Gresswell, 2006; Soula, 2009). Esto concuerda con los resultados descritos en este estudio, donde a pesar de no existir diferencias estadísticamente significativas en mortalidad entre peces marcados y no marcados, la mayor parte de ésta se produjo en la primera semana de cada uno de los experimentos. En cuanto a la mortalidad por rango de pesos, los resultados del presente estudio están en concordancia con los resultados encontrados por Acolas *et al.* (2007) en truchas

comunes de entre 4 a 7 cm, quienes observaron una asociación inversa entre la longitud y la mortalidad, obteniendo valores del 5% y del 1% en peces con menores y mayores de 5,7 cm respectivamente. Soula *et al.* (2009), marcaron bocinegros de tres rangos de pesos y obtuvieron unas mortalidades de 14,4% para los de entre 3 y 4 g, 9% para los de 4 y 5 g y 2,8% para los de más de 5 g. En tilapia del Nilo de entre 4 a 7 gramos, Baras *et al.* (1999) obtuvieron una mortalidad similar que la encontrada en uno de los grupos de peces del segundo experimento del presente estudio que tenían igual rango de pesos corrigiendo respecto a los controles. Contrariamente, para peces con peso inferior a los 4 gramos, los mismos autores obtuvieron una mortalidad mucho mayor (17%) a la encontrada en el primer experimento de este estudio (2,8%). La causa de esta diferencia está posiblemente en el protocolo de marcaje, puesto que Baras *et al.* (1999) responsabilizan parte de la mortalidad a talla pequeña al daño ocasionado en órganos por la escisión realizada cerca del ano. En carpa asiática, Mahapatra *et al.* (2001) observaron mortalidades también altas para peces marcados, pero sin corregirlas respecto a los peces control. Las cuales fueron del 20% para peces comprendidos entre 2 y 4 gramos, 12% para peces entre 4 y 6 gramos y 10% para peces entre 6 y 8 gramos. En el segundo experimento del presente estudio, se obtuvo una mortalidad 3,8 veces menor para peces marcados con los mismos rangos de pesos, sin corregir con respecto a los controles (5,5%, 2,5% y 3,3% para 2-4 g, 4-6 g y 6-8 gramos respectivamente). Dicha diferencia también puede ser debida al protocolo de marcaje, puesto que Mahapatra *et al.* (2001) no hicieron incisión previa a la introducción del PIT. En este sentido, Baras *et al.* (1999) determinaron en tilapias del Nilo de entre 4 a 7 gramos, mortalidades sustancialmente menores para peces marcados sin incisión previa (70%) que para los que sí se les hizo (0%).

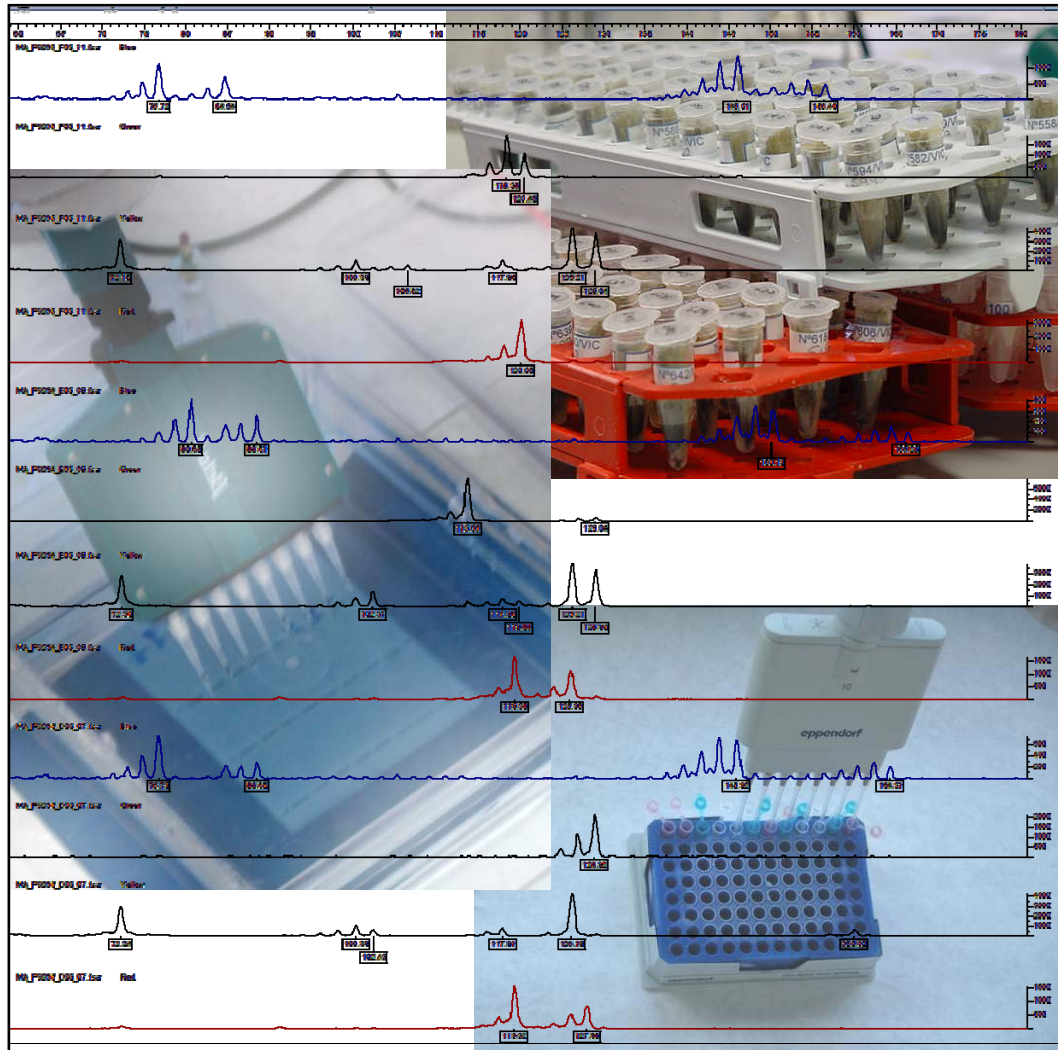
En el presente estudio, comparando las tasas de pérdida entre los tres experimentos y entre rangos de peso dentro del segundo experimento, se observó un efecto estadísticamente significativo de la talla de marcaje sobre la tasa de pérdida, siendo los peces más pesados los que mostraron un valor menor. Estos resultados están en concordancia con los encontrados en otras especies. En salmón rojo, Prentice *et al.* (1989) obtuvieron tasas de pérdida del 1% para peces de 6,8 cm y del 0% para peces de 8,2 cm. En trucha común de entre 4 a 7 cm, Acolas *et al.* (2007), aunque con valores altos en general, obtuvieron tasas del 30% y 20% en peces mayores y menores de 5,7 cm respectivamente. En perca europea, Baras *et al.* (2000) observan una tasa de pérdida del 20% para peces de entre 2 y 11 gramos, mientras que Ingram (1994), en perca dorada de entre 32 y 51 cm observan una tasa del 0%. Sorprendentemente, Mahapatra *et al.* (2001), en carpa asiática encuentran las mayores tasas de pérdida en los peces de mayor talla, 4% para peces de más de 15 gramos y 0% para peces de entre 2 y 15 gramos. Igualmente, aunque con valores mucho mayores, Baras *et al.* (1999), en tilapia del Nilo, obtienen 14,3% para pesos de entre 4 y 7 gramos y 10% entre 2 y 4 gramos, incluso cuando el tiempo de restauración de la herida de inserción del PIT fue de tan solo 10 días. También, Quartararo y Bell, 1992, en dorada australiana, obtuvieron una tasa de pérdida que osciló entre el 4 y el 8%, según el tanque, para peces con un alto peso ( $59 \pm 18$  g de media). Estos resultados junto con los del presente estudio, contrastan con las bajas tasas de pérdida encontradas por Dare (2003), en salmón chinook de longitudes comprendidas entre 10 y 20 cm, que obtienen un valor de sólo el 1%, y por Bateman y Gresswell (2006) en trucha arcoiris de entre 7 y 9 cm, que obtienen una tasa de pérdida del 3%. Esto puede ser explicado posiblemente porque su morfología es más fusiforme, disponiendo de mayor espacio longitudinal para el PIT en la cavidad abdominal, al igual que

otros salmones (Prentice *et al.*, 1989) o carpas (Mahapatra *et al.*, 2001) e incluso en otros espáridos más alargados, como puede ser el bocinegro, donde Soula *et al.* (2009) encuentran una tasa de pérdida del 1,3% en peces de entre 3 y 7 g.

Es interesante destacar que la realización de una incisión previa a la introducción del PIT favorece el proceso de cicatrización (Baras *et al.*, 1999, 2000). El tiempo de cicatrización completa de la herida de inserción del PIT es variable, siendo de 10 días para tilapia del Nilo (Baras *et al.*, 1999), 18 días para perca europea (Baras *et al.*, 2000), 30 días para bocinegro (Soula *et al.*, 2009), 32 días para salmón del Atlántico (Roussel *et al.*, 2000), de 47 días para salmón rojo (Prentice *et al.*, 1989) y aproximadamente 20 días para dorada en el presente estudio, cuando se inserta el PIT en la cavidad abdominal. Estas diferencias pueden ser debidas a las diferentes tallas de marcaje o a las características propias de cada especie, como la tasa de crecimiento.

Considerando conjuntamente las tasas de mortalidad y de pérdida del PIT, los datos del presente estudio demuestran que el peso medio idóneo para marcar alevines de dorada con el sistema PIT es el de los 6,5 gramos (rango de 4 a 8 gramos). Sin embargo, es factible marcar peces comprendidos entre los 3 y los 4 gramos, ya que no se encontraron diferencias significativas en mortalidad para peces con pesos superiores a los 3 gramos entre los distintos experimentos de este estudio ( $P > 0,05$ ), y donde la alta tasa de pérdida del PIT pudo haber sido debida a la falta de experiencia en el marcaje. Esto está en concordancia con los resultados encontrados por Dare (2003), quien observó una fuerte asociación entre la experiencia del marcador con la tasa de pérdida de la marca, ya que el 27,5% de los PIT no encontrados al final del experimento, se perdieron durante los dos primeros días de los 17 que utilizaron para marcar más de 100.000 peces.

Por otro lado, tampoco es recomendable una talla marcaje inferior a los 3 gramos, puesto que por debajo de esta talla la mortalidad si es significativamente mayor y no depende de la experiencia del marcador, como se observó en el segundo experimento del presente estudio.



### 3. DESARROLLO DE DOS NUEVAS PCR MÚLTIPLEX PARA DOS ESPECIES DE ESPÁRIDOS: DORADA (*Sparus auratus* L.) Y SAMA ROQUERA (*Pagrus auriga*)

A. Navarro, R. Badilla, M.J. Zamorano, V. Pasamontes, S. Hildebrandt, J.J. Sánchez, J.M. Afonso, 2008. Development of two new microsatellite multiplex PCRs for three sparid species: gilthead seabream (*Sparus auratus* L.), red pogy (*Pagrus pagrus* L.) and redbanded seabream (*P. auriga*, Valenciennes, 1843) and their application to paternity studies. **Aquaculture** **285**, 30-37.

V. Pasamontes, A. Navarro, M.J. Zamorano, R. Badilla, R. Ginés, D. Negrín, J.M. Afonso, 2007. Microsatellite diversity in natural and cultured populations of redbanded seabream (*Pagrus auriga*) using interspecific markers. **Aquaculture Europe'07**. Octubre 2007, Istanbul, Turkey.





### 3.1. INTRODUCCIÓN

---

La dorada (*Sparus auratus* L.) y la sama roquera o urta (*Pagrus auriga*, Valenciennes, 1843) son especies de espáridos bien establecidas en los hábitos alimenticios de los consumidores. La dorada es una especie consolidada en la acuicultura mediterránea, mientras que la sama roquera constituye una nueva especie, la cual ya ha sido cultivada en el área del Mediterráneo, debido a que es una especie conocida y apreciada entre la población y que requiere de un sistema de producción que se adapta bien a los sistemas de cultivo ya implantados para otras especies como la dorada.

Al igual que la dorada, la industria de la sama roquera realiza puestas masales con el fin de asegurar la calidad y la cantidad de la producción. Esto que presenta el inconveniente de desconocer la genealogía de los peces bajo cultivo, cuando ésta es fundamental para estimar parámetros genéticos en el desarrollo de esquemas de selección genética, por lo que es necesaria la determinación del parentesco a partir de marcadores moleculares.

Los marcadores microsatélites se han erigido como una potente herramienta para reconstruir las relaciones familiares de descendientes de lotes de peces de distintas especies (Norris *et al*, 2000; Doyle *et al*, 2001; King *et al*, 2001; Castro *et al*, 2004). En el caso de los espáridos, ha sido descrito un número considerable de marcadores microsatélites con un alto nivel de polimorfismo, en dorada (Batargias *et al.*, 1999 ; Launey *et al.*, 2003 ; Brown *et al.* 2005a ; Senger *et al.*, 2006), en dorada japonesa (*Pagrus major*; Takagi *et al.*, 1997), en dorada australiana (*Pagrus auratus*; Adcock *et.al.*, 2000), en besugo (*Pagellus bogaraveo*; Stockley *et al.*,2000; Piñera *et al*, 2006), en breca (*Pagellus erythrinus*; RamSak *et al.*

2003), y en sama roquera (Ponce *et al.*, 2006). Además, la conservación de regiones flanqueantes de marcadores microsatélites entre especies de espáridos permite la amplificación interespecífica (Takagi *et al.*, 1997; Oliva *et al.* 2003; Brown *et al.*, 2005a; Jean *et al.*, 2006; Piñera *et al.*, 2006; Roques *et al.*, 2006), y establecer PCR múltiplex.

El desarrollo de PCR múltiplex permite reducir los costes económicos por reacción (Neff *et al.*, 2000; Wesmajervi *et al.*, 2006) y optimizar los análisis de reconstrucción de genealogía y variabilidad genética de las poblaciones. Sin embargo, para asegurar el éxito de una nueva múltiplex PCR, es necesario evaluarla y validarla antes (Markoulatos *et al.*, 2002), y debe de contener un número adecuado de marcadores para que sea útil para resolver genealogías (Bernatchez y Duchense, 2000). En espáridos, han sido propuestas algunas reacciones múltiplex, combinando exclusivamente marcadores microsatélites específicos de cada especie y con idénticas temperaturas de hibridación. En dorada, Launey *et al.* (2003) propusieron dos reacciones multiplex, de tres y cinco marcadores, mientras que Brown *et al.* (2005a), propusieron y comprobaron la amplificación de una PCR múltiplex compuesta de cuatro marcadores microsatélites. En breca, Ramsak *et al.* (2003) desarrollaron una PCR múltiplex con tres marcadores microsatélites, mediante la técnica de *touchdown*.

Con el presente estudio se pretende desarrollar para dos especies de espáridos (dorada y sama roquera), dos PCRs múltiplex robustas para un elevado número de marcadores microsatélites polimórficos, rediseñando juegos de cebadores a partir de marcadores microsatélites específicos de dorada e interespecíficos de otros espáridos, que permitan realizar el análisis genético automatizado de los núcleos de reproductores y diagnosticar sus relaciones de

parentesco, a la vez que determinar las relaciones parentales-descendientes pertenecientes a lotes de peces producidos mediante puestas masales controladas. Su desarrollo pondrá en manos de la industria de dorada una herramienta fundamental para la implantación de programas de selección y desarrollo de la gestión de sus reproductores con criterios de consanguinidad, a la vez que una tecnología que respeta la idiosincrasia de su sistema de producción.

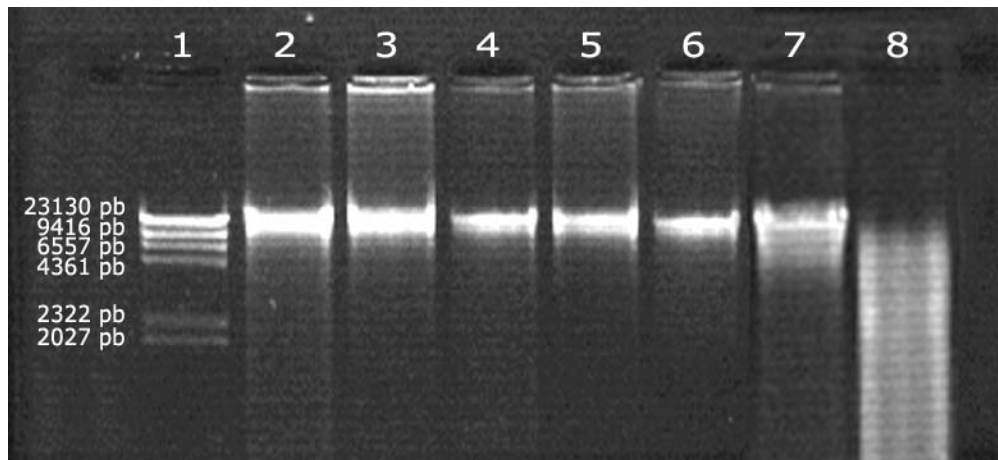
## 3.2. MATERIALES Y MÉTODOS

---

### **3.2.1. Muestras**

Se analizaron un total de 273 peces. Los 148 de dorada, consistieron en un lote de 66 reproductores de sexo desconocido procedentes de la empresa Tinamenor S.A. (San Vicente de la Barquera, Cantabria, España) y una muestra de 82 descendientes de éstos, obtenidos por puesta masal. Los 125 peces de sama roquera constituían un lote de reproductores pertenecientes al Instituto Canario de Ciencias Marinas (Islas Canarias, España).

La extracción de DNA se realizó a partir de un trozo de aleta caudal, previamente conservada en etanol absoluto y a temperatura ambiente, siguiendo el método del fenol-cloroformo descrito por Sambrook *et al.* (1989). El ADN extraído se conservó a 4°C en TE (Tris 0,01 mM y EDTA 0,001 mM, pH 8,0) y se evaluó su cantidad y su calidad mediante electroforesis (8 v cm<sup>-1</sup>) en gel de agarosa al 1% durante 55 minutos, con el fago *Lambda* cortado con la endonucleasa *Hind III* como marcador de peso molecular, y utilizando bromuro de etidio (0,5 µg µl<sup>-1</sup>) y un transiluminador de luz UV para su revelado (Figura 6). La imagen del gel se analizó con el programa *Quantitty One 1-D Analysis Software*.



**Figura 6:** Muestras de ADN en gel de agarosa al 1%. Pocillo 1: marcador de peso molecular Lambda *Hind III*; pocillos 2-7: Muestras de ADN íntegro; pocillo 8: Muestra de ADN degradado.

### **3.2.2. PCR Multiplex**

#### **Rediseño de cebadores:**

En el presente estudio se desarrollaron dos reacciones múltiplex de PCR, llamadas RimA y RimB (*Redesigned interspecific multiplex*), para la dorada y la sama roquera. Para ello se partió de 27 marcadores microsatélites descritos en diferentes especies de espáridos: 21 marcadores descritos en dorada, (Batargias *et al.*, 1999; Launey *et al.*, 2003; Brown *et al.*, 2005a), dos en la dorada japonesa (Takagi *et al.*, 1997), uno en la dorada australiana (Adcock *et al.*, 2000), y tres en el besugo (Stockley *et al.*, 2000). Los marcadores se seleccionaron en base al polimorfismo mostrado en poblaciones naturales y cultivadas de dorada (Oliva *et*

**Tabla 5:** Nombre del locus, fluorocromo y secuencias de los cebadores rediseñados y referencia de cada marcador microsatélite.

| Locus                 | Fluorocromo | Secuencia del cebador F rediseñado (5'→3') | Secuencia del cebador R rediseñado (5'→3') | Referencia                     |
|-----------------------|-------------|--|--|--------------------------------|
| <b>Multiplex RimA</b> |             |  |  |                                |
| <i>SauK140/INRA</i>   | 5* 6-FAM    | CATGCAACGGGTAGGT                           | GTATGCTTGGCAAGTGTATGTGTGTC                 | Launey <i>et al.</i> (2003)    |
| <i>Pma2b</i>          | 5* 6-FAM    | AGGTGAGGAGCAAGAGAGAGAG                     | GTTTCGACACTACCTTTCACCTAAATCA               | Takagi <i>et al.</i> (1997)    |
| <i>SauD182/INRA</i>   | 5* 6-FAM    | GTCTCACACCAGATTCAAGACAGTA                  | GTTTACTTCTGTGTTTCATCTTCATCTCG              | Launey <i>et al.</i> (2003)    |
| <i>SauG46/INRA</i>    | 5* 6-FAM    | CAAGGTGCGCGGTGCT                           | GTTTACTGCCAAGGTCAGAGTCACA                  | Launey <i>et al.</i> (2003)    |
| <i>SaG732</i>         | 5* 6-FAM    | GAACACACGCTGCATACAC                        | GTTTGTGGAGGTCAGAGAGGATAATG                 | Batargias <i>et al.</i> (1999) |
| <i>PbMS6</i>          | 5* NED      | TTATTCTACGACACACGACTGTG                    | GACACTGGACGACAGACAGAC                      | Stockley <i>et al.</i> (2000)  |
| <i>SauH98/INRA</i>    | 5* NED      | AACTTAGCAGGGGAGGCTA                        | GTTTCACAAGTGTGCTGAAAGATTACTGT              | Launey <i>et al.</i> (2003)    |
| <i>SauE97/INRA</i>    | 5* NED      | CATGTGTAATAATCGGTGGAGTTAC                  | GTTTCGGTACCGGGGTCAAATA                     | Launey <i>et al.</i> (2003)    |
| <i>Sal12</i>          | 5* NED      | GTAACAAATGTTAACGGGGAGTG                    | GTTTACCAGACAGCAAAACTGGAT                   | Brown <i>et al.</i> (2005a)    |
| <i>PaG42a</i>         | 5* PET      | GACAGAGGGGAGTGGATGTG                       | GTTTATCATCATCATCAGTCAGAGC                  | Adcock <i>et al.</i> (2000)    |
| <i>SauH94/INRA</i>    | 5* PET      | CTCTGTATGAACATAAACACAGAGC                  | GTTTATAAATCTTGAGGCTGGACAGAAAAG             | Launey <i>et al.</i> (2003)    |
| <i>SauD69/INRA</i>    | 5* PET      | GTGTGAAATGGGTTGATCC                        | GTTTGTGGATTTGAAACTCTGCTAAC                 | Launey <i>et al.</i> (2003)    |
| <i>SauI47/INRA</i>    | 5* VIC      | GCCAGCCAGGTTACGTC                          | GTTTCCATATCATACACTGTGGCTA                  | Launey <i>et al.</i> (2003)    |
| <i>PbMS2*</i>         | 5* VIC      | CTCGCGTAGTTGTTCCACAGAGC                    | GCAACAAATGGAGGTTCTGCATC                    | Stockley <i>et al.</i> (2000)  |
| <i>SaG726</i>         | 5* VIC      | ATATCACGCCCTCTCAACCGTATGTA                 | GCATCTAGGCCCTATGTTGGTATTAG                 | Batargias <i>et al.</i> (1999) |
| <b>Multiplex RimB</b> |             |  |  |                                |
| <i>SaG731</i>         | 5* 6-FAM    | TGTGCTGTTCAATCCTCAGC                       | GCACCAGAGTTTAAATCAGTTTC                    | Batargias <i>et al.</i> (1999) |
| <i>SauE82/INRA</i>    | 5* 6-FAM    | ATGACTTGAACACACTTGGGAGT                    | GTTTGACCCCTAAGCATGTCCTCTTC                 | Launey <i>et al.</i> (2003)    |
| <i>PbMS16</i>         | 5* 6-FAM    | GGTCGGAGAGTCAACAACAGT                      | GTTTAAATAGGACAGGGGCTAGTTTATCT              | Stockley <i>et al.</i> (2000)  |
| <i>Sal14</i>          | 5* 6-FAM    | TCACTATACAGTACATGATACAC                    | GTTTAGGACAAGGAGAGAAAGAAATGAC               | Brown <i>et al.</i> (2005a)    |
| <i>SauAN/INRA</i>     | 5* NED      | AGGTAAAGAGACACCACTAAGACA                   | GTTTCAGGCAAAACCAATAATGCTA                  | Launey <i>et al.</i> (2003)    |
| <i>Sal19</i>          | 5* NED      | ATGAAGAATTTGCTCGACTGCAC                    | GTTTCATCGAGTCTCTGGAATCAG                   | Brown <i>et al.</i> (2005a)    |
| <i>Sal15</i>          | 5* NED      | TGCTTTCTGTCCCTCACACTTAT                    | GTTTAGTAGTGGAGTAACACAGGCTCAGT              | Brown <i>et al.</i> (2005a)    |
| <i>SaG741b*</i>       | 5* PET      | GGAGGCATTCGAAGTGCAG                        | AGATGGCAGAGGCTCGGTAG                       | Batargias <i>et al.</i> (1999) |
| <i>Sal10</i>          | 5* PET      | GGACCAAGACTGCATAATAACAT                    | GGTGAGAAATAATAGCTCCCTATAGACC               | Brown <i>et al.</i> (2005a)    |
| <i>Sal21</i>          | 5* VIC      | ACCATGTTACAAAGCTGTGGTA                     | GTTTCAGCAAAGTTCAGCGAAATG                   | Brown <i>et al.</i> (2005a)    |
| <i>SauI41/INRA</i>    | 5* VIC      | GTGATTACAGGGTTAACGAGCAG                    | GTTTACACGCTTAACCTGTGATTAGCTTC              | Launey <i>et al.</i> (2003)    |
| <i>Pma1</i>           | 5* VIC      | CCAGTATCCAATGTGCCTTTATG                    | GTTTCAGACTTGCAAAAGAAAACAGGAC               | Takagi <i>et al.</i> (1997)    |

\* Locus con la secuencia original de los cebadores descritas por los autores.

*al.*, 2005), a informaciones de ligamiento (Dermitzakis *et al.*, 1998; Launey *et al.*, 2003; Franch *et al.*, 2006), y a la presencia de regiones flanqueantes de ADN que no interfirieran en el polimorfismo del marcador. Teniendo en cuenta esto y siguiendo las recomendaciones de Sánchez *et al.* (2003), RimA y RimB se diseñaron con 15 y 12 marcadores microsatélites respectivamente (Tabla 5).

Antes de utilizar todos los marcadores juntos en una PCR múltiplex, cada pareja de cebadores se utilizó individualmente en una PCR simple sobre 5 muestras de cada especie, para identificarlo y para comprobar su correcta amplificación y el rango de tamaños de los alelos. Los marcadores que no amplificaron individualmente se descartaron de cada reacción de PCR múltiplex.

Inicialmente se usó una concentración de 0,3  $\mu\text{M}$  de cada cebador en ambas múltiplex. Secuencialmente, se fueron modificando las concentraciones de cada pareja de cebadores hasta obtener picos de fluorescencia de una altura de entre 600 y 3000 RFU (*Relative Fluorescent Unit*) para cada marcador microsatélite, empezando por reducir la concentración de los marcadores con picos altos y luego aumentando la de aquellos con picos bajos. Cada prueba se realizó sobre 5 muestras de cada especie, y se modificó la concentración de un solo microsatélite, en un rango de entre 0,01  $\mu\text{M}$  y 0,05  $\mu\text{M}$ , y teniendo en cuenta que la concentración final de cebadores no superara los 0,7  $\mu\text{M}$ . En la Tabla 6, se muestran los marcadores que constituyeron finalmente cada RimA y RimB en cada especie, y la concentración de sus cebadores.

**Tabla 6:** Concentración final de los cebadores de cada marcador microsatélite ( $\mu\text{M}$ ), en ambas reacciones múltiplex, para dorada y sama roquera.

| <i>Locus</i>          | Concentración ( $\mu\text{M}$ ) de cada cebador |              |
|-----------------------|---|--------------|
|                       | Dorada  | Sama roquera |
| <b>Múltiplex RimA</b> |   |              |
| <i>SauK140INRA</i>    | 0,05  |              |
| <i>SauD182INRA</i>    | 0,06  |              |
| <i>SauG46INRA</i>     | 0,06  | 0,04         |
| <i>SaGT32</i>         | 0,09  | 0,06         |
| <i>SauH98INRA</i>     | 0,08  | 0,06         |
| <i>SaI12</i>          | 0,06  | 0,06         |
| <i>PaGA2a</i>         | 0,08  | 0,06         |
| <i>SauH94INRA</i>     |   | 0,06         |
| <i>SauD69INRA*</i>    | 0,05  |              |
| <i>SauI47INRA</i>     | 0,06  | 0,02         |
| <i>PbMS2</i>          | 0,06  | 0,10         |
| <b>Múltiplex RimB</b> |   |              |
| <i>SaGT31</i>         | 0,05  |              |
| <i>SauE82INRA</i>     | 0,06  | 0,08         |
| <i>SaI14</i>          | 0,09  |              |
| <i>SauANINRA</i>      | 0,06  |              |
| <i>SaI19</i>          | 0,08  |              |
| <i>SaI15</i>          |   | 0,12         |
| <i>SaGT41b</i>        | 0,10  | 0,13         |
| <i>SauI41INRA</i>     | 0,07  | 0,17         |
| <i>Pma1</i>           |   | 0,04         |

\*Este marcador también amplifica en RimB en dorada con una concentración de 0,07  $\mu\text{M}$ .



### **Condiciones de PCR:**

Las condiciones de tiempo y temperatura en la amplificación de ambas PCR multiplex fueron: un periodo inicial de desnaturalización de 10 minutos a 94°C, seguidos de 30 ciclos consistentes en 30 segundos a 94°C de desnaturalización, 1 minuto a 60°C de hibridación y otro minuto a 72°C de elongación, y finalmente un periodo de elongación durante 80 minutos a 65°C, las cuales se llevaron a cabo en un termociclador i-Cycler (Bio-Rad®). En la Tabla 7 se muestran los volúmenes y concentraciones de cada componente en la reacción de PCR, la cual se desarrolló en un volumen final de 12,5 µl, y salvo en las concentraciones de cebadores y de cantidad de ADN, fueron idénticas en ambas múltiplex.

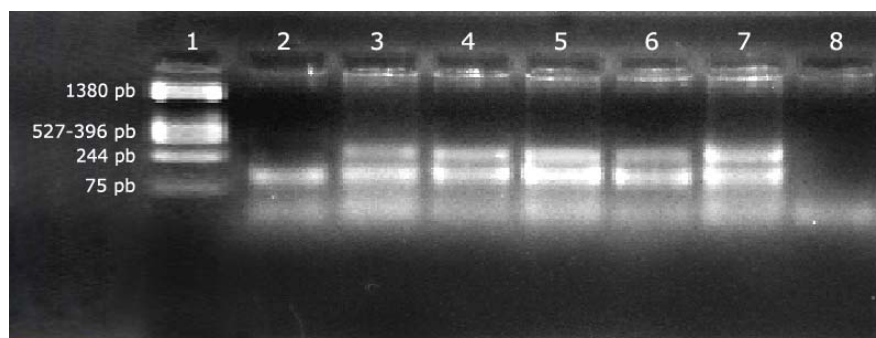
**Tabla 7:** Volumen y concentración de cada componente en la reacción de PCR, en ambas múltiplex, en un volumen final de 12,5 µl.

| Componente  | Volumen (µl) | Concentración     |
|---|--------------|-------------------|
| GeneAmp PCR Buffer II (100 mM Tris-HCl pH 8,3; 500 mM KCl) (Applied Biosystem®) | 1,5          | 0,12 X            |
| MgCl <sub>2</sub> (Applied Biosystem®)  | 1,5          | 3 mM              |
| dNTPs (Roche®)  | 0,25         | 0,2 mM            |
| Ampli $Taq$ Gold DNA polymerase (Applied Biosystem®)                            | 0,1          | 0,04 unidades/µl  |
| Mezcla de cebadores   | 2            | 0,5-0,7 µM        |
| DNA molde   | 1            | 10-40 ng/reacción |

Para determinar la cantidad de ADN en cada múltiplex, se probaron 4 cantidades: 3, 10, 20 y 40 ng por reacción. Respecto a su calidad, cuando de alguna muestra se obtenía ADN degradado o con inhibidores de la Taq polimerasa, se utilizó BSA ( $0,8 \mu\text{g } \mu\text{l}^{-1}$ ) (*Bovine Serum Albumin*) como adyuvante de la PCR, el cual incrementa su eficiencia y es eficaz en PCR múltiplex (Henegariu *et al.*, 1997).

### **Condiciones de la carrera:**

A las reacciones de PCR múltiplex, antes de correrlas en el secuenciador automático, se les comprobó su correcta amplificación, mediante una electroforesis ( $8 \text{ v } \text{cm}^{-1}$ ) en gel de agarosa al 2% durante 30 minutos, cargando una alícuota de cada muestra y el *pGEM3Z* cortado con *Hin FI* como marcador de peso molecular, y al igual que antes, la imagen del gel se analizó con el programa *Quantitty One 1-D Analysis Software*. En general, una correcta amplificación de la RimA en ambas especies muestra 2 bandas, una ligera que contiene los microsatélites con un tamaño de amplificación de entre 60 y 190 pb y otra pesada que contiene los de un tamaño de entre 210 y 280 pb, como se puede apreciar en la Figura 7, la cual muestra un ejemplo en dorada. La amplificación de la RimB en dorada produce una sola banda ancha en el gel debido al amplio rango de tamaños del marcador *Sal19*, mientras que en sama roquera no produce banda pesada, debido a la ausencia de microsatélites con tamaños de amplificación superiores a 180 pb.



**Figura 7:** Reacciones de RimA en dorada, en gel de agarosa al 2%. Pocillo 1: marcador de peso molecular *pGEM3Z* cortado con *Hin* *FI*; pocillo 2: Amplificación a partir de ADN degradado; pocillos 3-7: amplificaciones correctas; pocillo 8: control negativo.

Una vez verificada la correcta amplificación, se cargó 1  $\mu$ l del producto de reacción de la PCR junto con 9,75  $\mu$ l de formamida Hi-Di y 0,25  $\mu$ l del marcador de peso molecular GeneScan 500-250 LIZ (*Applied Biosystem*<sup>®</sup>) en el secuenciador automático ABI Prism<sup>®</sup> 3100 (*Applied Biosystem*<sup>®</sup>) de 36 capilares usando el POP-4. En el caso de la RimB, el producto de PCR previamente se diluyó al 50% con agua Milli-Q. El electroferograma se analizó utilizando el programa GeneScan (v3.7) y los genotipos se determinaron usando el Genotyper (v3.7), ambos de *Applied Biosystem*<sup>®</sup>.

### **3.2.3. Análisis de los datos**

Utilizando el programa Cervus (v3.0) (Kalinowski *et al.* 2007) se calculó: el test del equilibrio de Hardy-Weinberg, la probabilidad de exclusión y la probabilidad de exclusión combinada para las que se usó la opción de *parent pair* (Jamieson y Taylor, 1997), la heterocigocidad observada y esperada y por último

la frecuencia teórica de alelos nulos (Summers y Amos, 1996) ). Las asignaciones familiares en las muestras de dorada, de las que se desconocía el sexo de los reproductores, se determinaron usando el método de exclusión mediante un programa no comercial escrito en lenguaje FORTRAN cedido por Dr. J. Fernández (INIA-Madrid, España).

### 3.3. RESULTADOS

---

Las PCR múltiplex RimA y RimB mostraron una alta reproducibilidad y robustez en las dos especies estudiadas. De los 15 y 12 microsatélites utilizados para diseñar la RimA y RimB, respectivamente, la cantidad de microsatélites que finalmente fueron incluidos en cada múltiplex fue distinta para ambas especies (Tabla 6). En dorada amplificaron adecuadamente diez marcadores en la RimA y siete en la RimB. Además, el marcador *SauD69INRA* amplificó en ambas múltiplex por lo que RimA y RimB pueden utilizarse en esta especie con diez y siete marcadores o con nueve y ocho, respectivamente, o bien, utilizar este marcador en las dos múltiplex para usarlo como control interno. Respecto a los marcadores *SaGT26*, *Sal15*, *Pma1* y *PbM16* en dorada amplificaron bien en PCR simple pero sin embargo no mostraron buenos resultados en las PCR múltiplex, por lo que finalmente no se incluyeron en ellas. En sama roquera amplificaron adecuadamente menos marcadores en ambas múltiplex que en dorada, incluyéndose ocho en la RimA y 5 en la RimB.

La morfología de los alelos de cada marcador para ambas múltiplex se muestra en la Figura 8 para dorada y en la Figura 9 para sama roquera. En la RimA, es importante tener en cuenta que en las dos especies, la carrera de los marcadores *SauI47INRA* y *Sal12*, ambos marcados con NED, produjo un pico en 72 pb (Figuras 8a y 9a).

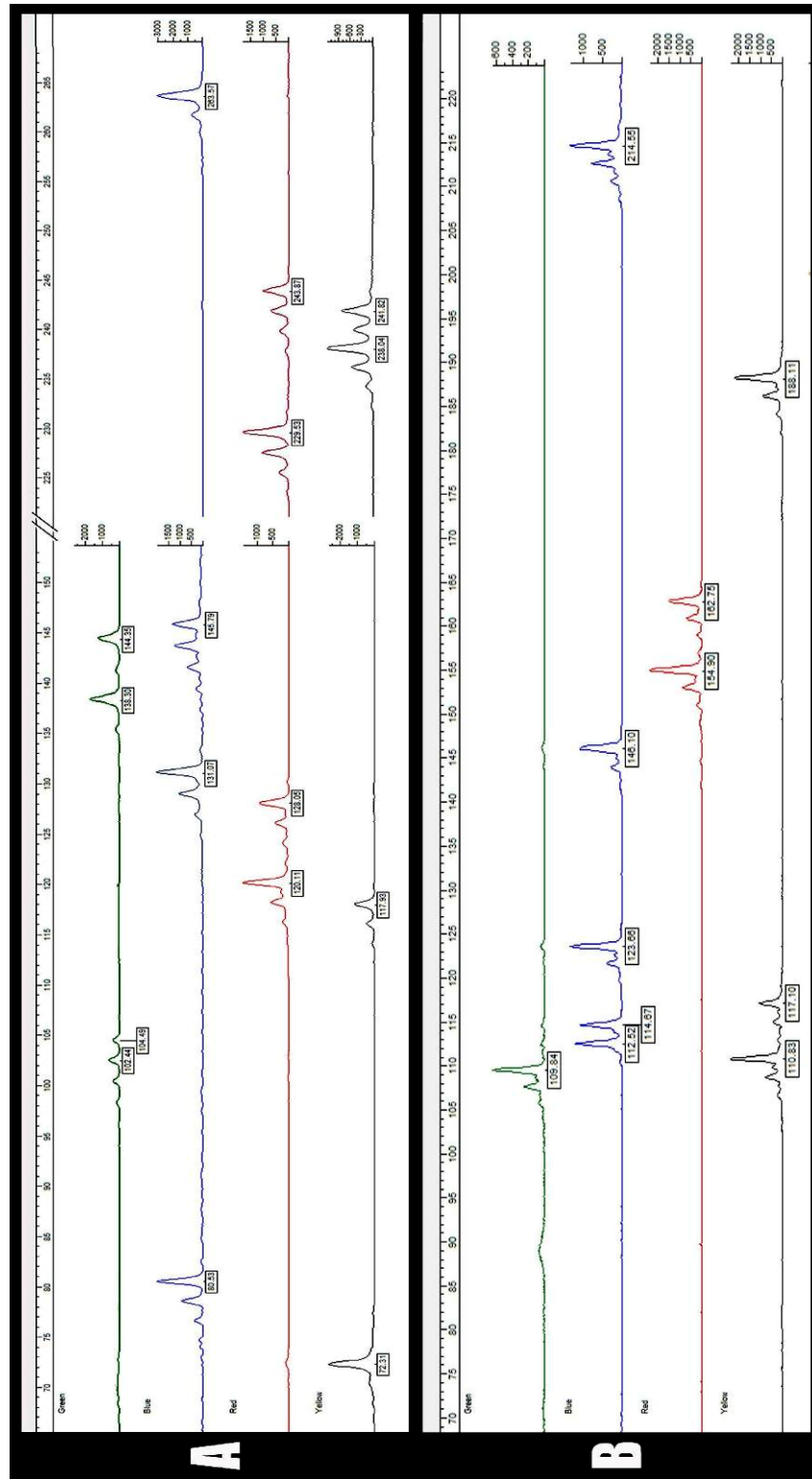


Figura 8: Morfología de los alelos de cada marcador microsatélite de ambas múltiplex en dorada. **A:** Múltiplex RimA. **B:** Múltiplex RimB.

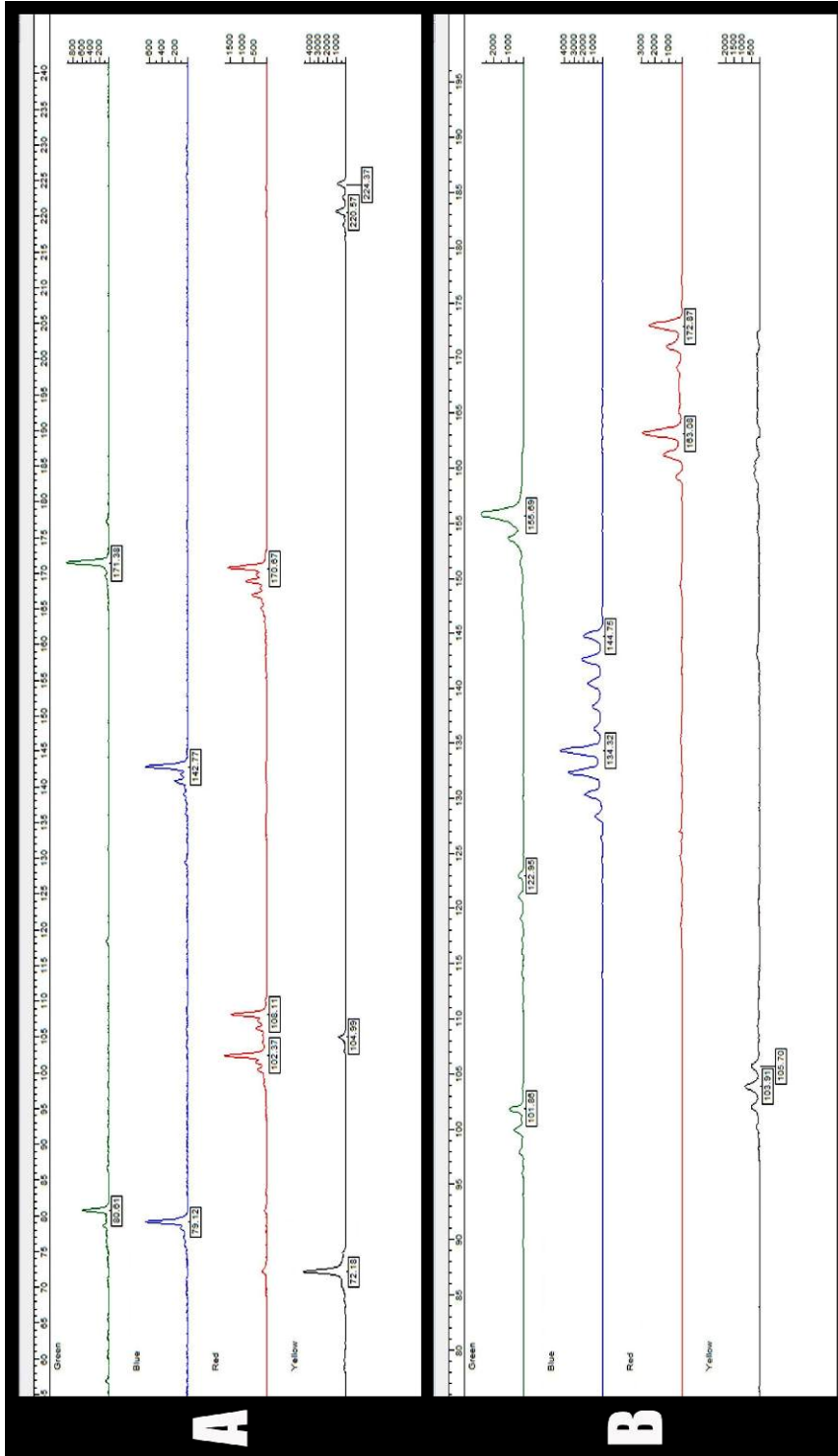


Figura 9: Morfología de los alelos de cada marcador microsatélite de ambas múltiplex en sama roquera. A: Múltiplex RimA. B: Múltiplex RimB.

Respecto a la cantidad de ADN molde para cada PCR múltiplex, la cantidad óptima determinada fue de 10-20 ng en la RimA y 20-40 ng en la RimB. Cantidades menores a éstas no garantizaban una lectura clara del genotipo de todos los marcadores en ambas múltiplex, mientras que 40 ng en la RimA producía interacciones entre los marcadores e incómodos reflejos entre los fluorocromos, que impedían o dificultaban la correcta lectura de los genotipos.

En las Tablas 8 y 9 se muestran los estimadores de diversidad genética (número y rango de tamaño de los alelos, heterocigocidad observada y esperada y probabilidad de exclusión) para cada uno de los marcadores microsatélites de ambas múltiplex en cada una de las especies estudiadas. En dorada, todos los marcadores estuvieron en equilibrio de Hardy-Weinberg, excepto el *SauI41INRA* debido a que su ya alta heterocigocidad observada fue inferior a la esperada, cuando su número de alelos fue máximo frente al resto de marcadores. Mientras que en sama roquera, los únicos marcadores que estuvieron en desequilibrio fueron *SauG46INRA* y *SauH94INRA*, los cuales mostraron bajas heterocigocidades observadas y un número escaso de alelos.

Las frecuencias teóricas de alelos nulos (Summers y Amos, 1996) de todos los marcadores mostraron un valor medio bajo en ambas especies, -0,03 en dorada y +0,02 en sama roquera, las cuales variaron entre -0,17 y +0,14 en dorada y entre -0,08 a +0,28 en sama. Mientras que la frecuencia real de alelos nulos, calculada a través de la segregación familiar, por lo que sólo pudo realizarse en dorada, fue de +0,01 considerando todos los loci de ambas múltiplex. El único locus en el que estuvieron presentes, el *PbMS2*, mostró una frecuencia real de +0,09, mientras que su frecuencia teórica fue de +0,14.



**Tabla 8:** Número y rango de tamaño de los alelos, heterocigocidad observada (H.O.) y esperada (H.E.) y probabilidad de exclusión (P.E.) de cada uno de los marcadores microsatélites de ambas múltiplex en dorada. Así como la Probabilidad de exclusión combinada a priori (P.E.C.) y el porcentaje real de asignación parental (P.R.A.), estimados de manera acumulada (\*), es decir, añadiendo un marcador más cada vez.

| <i>Locus</i>          | Nº de alelos | Rango   | H.O. | H.E. | P.E. (%) | P.E.C.* (%) | P.R.A.* (%) |
|-----------------------|--------------|---------|------|------|----------|-------------|-------------|
| <b>Múltiplex RimA</b> |              |         |      |      |          |             |             |
| <i>SauD69INRA</i>     | 18           | 222-268 | 0,85 | 0,92 | 94,8     | 92,10       | 0           |
| <i>SaGT32</i>         | 14           | 146-182 | 0,83 | 0,87 | 89,0     | 99,13       | 6,10        |
| <i>PbMS2</i>          | 11           | 126-165 | 0,82 | 0,86 | 86,8     | 99,88       | 34,15       |
| <i>SaI12</i>          | 12           | 220-264 | 0,79 | 0,84 | 84,9     | 99,98       | 62,20       |
| <i>PaGA2a</i>         | 10           | 114-142 | 0,86 | 0,84 | 85,0     | 100         | 87,80       |
| <i>SauK140INRA</i>    | 11           | 66-100  | 0,79 | 0,83 | 83,3     | 100         | 97,56       |
| <i>SauG46INRA</i>     | 9            | 110-134 | 0,65 | 0,81 | 79,3     | 100         | 100         |
| <i>SauD182INRA</i>    | 7            | 250-270 | 0,70 | 0,73 | 68,2     | 100         | 100         |
| <i>SauI47INRA</i>     | 7            | 88-106  | 0,70 | 0,63 | 57,5     | 100         | 100         |
| <i>SauH98INRA</i>     | 4            | 108-122 | 0,36 | 0,34 | 29,4     | 100         | 100         |
| <b>Múltiplex RimB</b> |              |         |      |      |          |             |             |
| <i>SauI41INRA</i>     | 21           | 86-162  | 0,71 | 0,91 | 94,1     | 94,13       | 0           |
| <i>SaI14</i>          | 12           | 200-240 | 0,92 | 0,91 | 93,4     | 99,61       | 0           |
| <i>SaGT41b</i>        | 16           | 142-196 | 0,94 | 0,90 | 93,1     | 99,97       | 36,59       |
| <i>SaI19</i>          | 8            | 184-212 | 0,79 | 0,82 | 82,1     | 100         | 59,76       |
| <i>SauE82INRA</i>     | 9            | 120-150 | 0,83 | 0,81 | 79,8     | 100         | 78,05       |
| <i>SauANINRA</i>      | 5            | 111-119 | 0,77 | 0,70 | 62,8     | 100         | 92,68       |
| <i>SaGT31</i>         | 4            | 112-118 | 0,62 | 0,59 | 49,0     | 100         | 100         |

**Tabla 9:** Número y rango de tamaño de los alelos, heterocigocidad observada (H.O.) y esperada (H.E.) y probabilidad de exclusión (P.E.) de cada uno de los marcadores microsatélites de ambas múltiplex en sama roquera

| <i>Locus</i>          | Nº de alelos | Rango tamaños | H.O. | H.E. | P.E. (%) |
|-----------------------|--------------|---------------|------|------|----------|
| <b>Múltiplex RimA</b> |              |               |      |      |          |
| <i>PbMS2</i>          | 10           | 138-177       | 0,74 | 0,82 | 81,7     |
| <i>SauH94INRA</i>     | 6            | 164-176       | 0,37 | 0,67 | 53,7     |
| <i>PaGA2a</i>         | 8            | 94-112        | 0,66 | 0,59 | 48,9     |
| <i>SauI47INRA</i>     | 6            | 74-84         | 0,53 | 0,56 | 38,8     |
| <i>SaI12</i>          | 6            | 210-228       | 0,48 | 0,49 | 41,5     |
| <i>SauH98INRA</i>     | 4            | 104-116       | 0,26 | 0,24 | 21,1     |
| <i>SaGT32</i>         | 4            | 138-148       | 0,16 | 0,17 | 16,1     |
| <i>SauG46INRA</i>     | 2            | 79-81         | 0,02 | 0,02 | 1,6      |
| <b>Múltiplex RimB</b> |              |               |      |      |          |
| <i>SauI41INRA</i>     | 12           | 100-134       | 0,83 | 0,90 | 92,3     |
| <i>SauE82INRA</i>     | 21           | 126-173       | 0,85 | 0,89 | 92,6     |
| <i>SaGT41b</i>        | 8            | 153-177       | 0,74 | 0,66 | 61,4     |
| <i>SaI15</i>          | 3            | 101-105       | 0,25 | 0,25 | 19,3     |
| <i>Pma1</i>           | 3            | 155-159       | 0,10 | 0,10 | 9,0      |

Las probabilidades de exclusión combinada a priori fueron muy altas para ambas multiplex. En las dos especies estudiadas mostraron valores de 0,999. Para el caso particular de dorada, fue posible estimar el porcentaje real de asignación parental sobre una población de reproductores y descendientes bajo puesta masal. Para comparar estos valores con los teóricos (probabilidad de exclusión), en cada múltiplex se ordenaron descendientemente los marcadores

según su heterocigocidad esperada y empezando con uno y añadiendo uno más cada vez, se estimó tanto la probabilidad exclusión combinada como el porcentaje real de asignación parental. Estos resultados se muestran en las dos últimas columnas de la Tabla 8, los cuales pusieron de manifiesto que los valores teóricos y reales fueron muy distintos cuando se consideraban pocos marcadores, de hecho, para asignar la totalidad de los descendientes se requirieron al menos siete marcadores microsátélites utilizando cada múltiplex, sin embargo, según las probabilidades de exclusión combinada a priori, el 100% de asignación se obtuvo con cinco marcadores con la RimA y con cuatro con la RimB.

### 3.4. DISCUSIÓN

---

El cultivo de especies de espáridos es llevado a cabo, en general, a través de puestas masales provenientes de aproximadamente 40 ó 60 reproductores, y donde las relaciones padres-hijos son desconocidas, por lo que la integración de esquemas de selección en estos sistemas de producción industrial requerieren de la conjunción de sistemas de identificación física y genética de los peces bajo explotación (Wesmajervi *et al.*, 2006). En espáridos, es posible la identificación física desde tallas pequeñas a través de sistemas de marcaje VIE (Astorga *et al.* 2004) y PIT (Navarro *et al.*, 2006), a la vez que la reconstrucción de las relaciones padres-hijos mediante el análisis de un número suficiente de marcadores microsatélites (Batargias *et al.*, 1999; Castro *et al.*, 2007; Jeong *et al.*, 2007), que combinados en PCR múltiplex minimizarían los costes de implementación (Neff *et al.* 2000).

La correcta inferencia de las relaciones de parentesco a la hora de desarrollar un programa de mejora es de gran importancia ya que condiciona la estima de los parámetros genéticos y la evaluación genética de los reproductores (Dodds *et al.* 2005). Los errores de lectura de los genotipos y las mutaciones son factores que afectan a la determinación del pedigrí (Jones y Ardren, 2003; Bonin *et al.*, 2004). Los errores de lectura de los microsatélites mediante PCR con sistemas de fluorescencia pueden ser debido a subbandas o picos falsos que pueden aparecer en el electroferograma, como son las bandas tartamudas, bandas reflejos, bandas inespecíficas o artefactos (Selkoe *et al.*, 2006). Por lo que la identificación de estos picos es clave para determinar correctamente los genotipos. En este sentido, el pico de 72 pb, que aparece en la RimA de este

estudio, se correspondió con un pico artefacto, probablemente a una aglomeración de cebadores, ya que apareció también en el control negativo de la PCR y sin embargo no apareció cuando los marcadores se amplificaron mediante PCR simples.

Es bien conocida la viabilidad de la amplificación por hibridación cruzada entre especies de reacciones simples de marcadores microsatélites (Roque *et al.*, 2006; Yang *et al.* 2006) y mediante multiplex (Paterson *et al.* 2004), la cual parece estar relacionada con la existencia de regiones flanqueantes conservadas de los marcadores microsatélites entre grupos de especies (Presa y Guyomard, 1996; Rogers *et al.*, 2004). En espáridos han sido descritas muy pocas reacciones múltiplex, tanto en cuanto a número de marcadores microsatélites como a su utilidad sobre diferentes grupos de especies. En breca, Ramsak *et al.* (2003) desarrollaron una PCR múltiplex con tres marcadores microsatélites, mediante la técnica de *touchdown*. En dorada, Launey *et al.* (2003) describieron dos reacciones múltiplex de marcadores microsatélites específicos, una de tres (*SauI47INRA*, *SauK140INRA* y *SauD182INRA*) y otra de cinco (*SauANINRA*, *SauE82INRA*, *SauE97INRA*, *SaGT26* y *SaGT31*), si bien dichos autores no indican las condiciones de amplificación ni probaron su utilidad en otras especies de espáridos. Brown *et al.* (2005a), describieron una sola reacción múltiplex de cuatro marcadores microsatélites específicos de dorada (*Sal12*, *Sal14*, *Sal19* y *Sal21*), sus condiciones de amplificación y su validez en la amplificación cruzada en otras cinco especies de espáridos (dentón, *Dentex dentex*; bocinegro, *Pagrus pagrus*; chopo, *Spondyllosoma cantharus*; sargo, *Diplodus sargas* y herrera, *Lithognathus mormyrus*). En el presente estudio, se establecieron dos reacciones multiplex para dos especies filogenéticamente muy relacionadas (Hanel y Sturmbauer, 2000; Herrán *et al.* 2001; Day, 2002), conteniendo algunos de los

marcadores microsatélites descritos en las múltiplex desarrolladas por Launey *et al.* (2003) y Brown *et al.* (2005a), y otros descritos en varias especies de espáridos (Takagi *et al.*, 1997; Batargias *et al.*, 1999; Adcock *et al.*, 2000; Stockley *et al.*, 2000), pero todos con juegos de cebadores rediseñados con el fin maximizar el número de marcadores por reacción múltiplex y minimizar con ello los costes de asignación familiar bajo condiciones industriales de puesta masal. Los resultados ponen de relieve la viabilidad interespecífica de ambas reacciones múltiplex en las dos especies estudiadas, ya que de los marcadores rediseñados inicialmente para la RimA y la RimB (Tabla 6) un 85% funcionaron en dorada y un 65% en sama roquera. Cinco marcadores de la RimA y tres de la RimB amplificaron en las 2 especies, lo que significó una exitosa amplificación cruzada. Esto contrasta con los resultados descritos por Brown *et al.* (2005a), quienes obtienen poca amplificación cruzada en otras cinco especies de espáridos, lo que significó que la múltiplex de cuatro marcadores que diseñaron para dorada se redujera a una simple dúplex, ya que sólo mostraron amplificación cruzada los marcadores *Sal12* y *Sal19* en dos especies, sargo y herrera.

Un inconveniente de utilizar marcadores microsatélites interespecíficos, tanto en PCR simple como en múltiplex, es la aparición de alelos nulos, ya que pueden causar falsas exclusiones en la asignación parental, considerando homocigotos a individuos heterocigotos (Callen *et al.*, 1993). Por lo que la detección de un exceso de homocigotos, bajo el modelo de Hardy-Weinberg, es un indicativo estimativo de la presencia de alelos nulos (Marshall *et al.*, 1998). En este estudio, para dorada, sólo se detectaron alelos nulos mediante la segregación familiar en el marcador *PbMS2* con una frecuencia similar a la teórica esperada (0,09 vs 0,14). Sin embargo, no se encontró desequilibrio de Hardy-Weinberg para este locus, posiblemente debido a que la frecuencia de este alelo nulo fue

baja. En sama roquera también se obtuvo en uno de los marcadores (*SauH94INRA*) una alta frecuencia esperada de alelos nulos (0,28), aunque en este caso sí se encontró desequilibrio de Hardy-Weinberg para este locus, corroborando la posible presencia de alelos nulos.

En mejora genética, es de gran importancia determinar un número de marcadores adecuado para la asignación del parentesco bajo condicionantes de producción de forma rutinaria, exacta y económica (Bernatchez y Duchense, 2000). Para ello, los estudios de simulación permiten definir un número orientativo de marcadores que se adecue a las circunstancias de las diferentes especies (Bernatchez y Duchense, 2000; Villanueva *et al.*, 2002), si bien la variación en el número de alelos y la distribución de los genotipos de los reproductores bajo cultivo no son homogéneos. En este estudio, en dorada, se obtuvo un éxito del 100% en la asignación parental utilizando al menos siete marcadores de la RimA o RimB (Tabla 8), lo cual está en concordancia con las predicciones mediante simulaciones realizadas por Bernatchez y Duchense (2000) y Villanueva *et al.* (2002). Además, el elevado número de marcadores incluidos en la RimA y RimB (diez y siete, respectivamente), asegura su utilidad en diferentes escenarios prácticos, tales como un alto número de reproductores contribuyentes en la puesta (Blouin *et al.* 1996; Liu y Cordes, 2004), un incremento de la homocigocidad (Marshall *et al.*, 1998) o la presencia de alelos nulos (Castro *et al.*, 2007). Cuando se usan pocos marcadores microsatélites, la presencia de alelos nulos produce asignaciones incorrectas (padres y/o madres falsos) y descendientes sin asignar, sin embargo cuando se incrementa el número de marcadores, al aumentar también su poder de exclusión, los alelos nulos sólo provocan descendientes sin asignar. De hecho, cuando se usó la RimA en dorada, un 14,6% de los descendientes quedaron sin ser asignados a ninguna pareja de

reproductores debido a la presencia de alelos nulos, los cuales, una vez que se permitió un error en el método de exclusión, se asignaron correctamente, lo que permitió identificar dichos alelos nulos. Una vez recodificados siguiendo las recomendaciones de Jones y Ardren (2003), se obtuvo un 100% de éxito en la asignación familiar (cada descendiente asignado a un padre y una madre). Del mismo modo, Castro *et al.* (2007), usando 11 marcadores microsatélites en dorada, asignaron cada descendiente a una pareja de reproductores, a pesar de la presencia de alelos nulos en cinco de los loci, los cuales se encontraron en una frecuencia de entre 0,005 y 0,084. Estos autores propusieron cinco de los once microsatélites, para reducir costes, como una batería de marcadores para asignación familiar (*SaGT1*, *SaGT26*, *SaGT41a*, *PbMS2* y *PbMS16*) y los escogieron debido a su alto polimorfismo, fácil lectura y ausencia de alelos nulos. No obstante, la presencia o ausencia de dichos alelos en un determinado marcador, depende de cada población, como se ha puesto de manifiesto en este estudio, en el que el *PbMS2* fue el único locus que mostró alelos nulos.

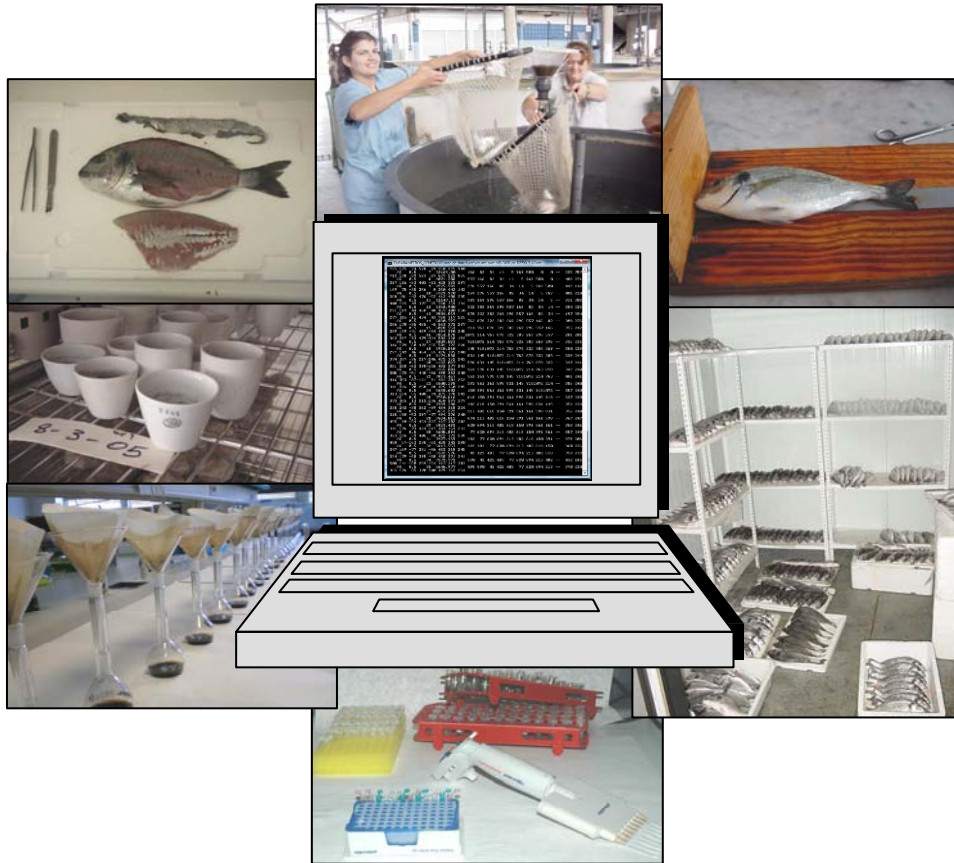
El desarrollo de reacciones múltiplex presenta la principal ventaja de minimizar los costes del genotipado optimizando la rentabilidad (Neff *et al.*, 2000; Wesmajervi *et al.*, 2006). En este sentido, Renshaw *et al.* (2006) obtuvieron un coste de material por muestra 3,5 veces menor realizando una tetraplex PCR que realizando las reacciones simples y de 6,7 veces mediante una octaplex, a la vez que reducciones similares en coste de personal. Mientras que Neff *et al.* (2000) necesitaron por muestra cuatro veces menos material fungible para genotipar cuatro microsatélites mediante una tetraplex PCR que mediante PCR simples. En el presente estudio, se compararon los costes de personal, material fungible y la carrera en el secuenciador automático, del genotipado de diez microsatélites mediante una PCR múltiplex como la RimA, con el genotipado



mediante PCR separadas, revelando una reducción de al menos 6,3 veces con la múltiplex, que con las simples, incluso cuando éstas se cargaban en una única carrera. Estos resultados pueden estimular a las compañías productoras de dorada a desarrollar estrategias genéticas de selección, ya que su implementación no requiere de la modificación de los sistemas de producción. Además, teniendo en cuenta que en el diseño de RimA y RimB, se tuvieron en cuenta las distancias de ligamiento, estas múltiplex podrían tener aplicabilidad en la búsqueda de QTL y selección asistida por marcadores (Frey *et al.*, 2004), donde la reducción de coste por marcador es fundamental.

Por otro lado, las reacciones múltiplex también minimizan los errores de genotipado, en el sentido de que reducen el número de pasos durante el proceso de análisis de una muestra, aumentando la automatización. Bonin *et al.* (2004) genotiparon por duplicado 34 muestras de osos pardos mediante 18 PCR simples de marcadores microsatélites y detectaron un 0,8% de diferencias entre las dos réplicas, que atribuyeron a errores debidos al factor humano. Estos autores concluyeron que una recomendación importante para disminuir los errores de genotipado sería la automatización en el trabajo de laboratorio. En este sentido, Las PCR múltiplex reducen el riesgo de contaminación y evitan que PCR de distintos individuos se mezclen en una sola carrera produciendo un genotipo erróneo. Esta ventaja puede verse reflejada en los resultados del presente estudio para dorada, donde se obtuvo un 100% de asignación familiar. Además la amplificación del marcador *SauD69INRA* en ambas múltiplex (RimA y RimB), proporcionó un control interno de genotipado, al igual que se utiliza en genética forense.

Los núcleos de reproductores de dorada se prestan a censos efectivos bajos debido a sus altas tasas de fecundidad, la alta varianza en el tamaño de la familia y la contribución deficiente de los machos frente a las hembras bajo puestas masales (Brown *et al.* 2005b). Sin embargo, la heterocigosidad media de dorada es alta, aunque algo inferior a la de poblaciones naturales, tal y como cabría esperar (Batargias *et al.*, 1999; Alarcón *et al.*, 2004; Brown *et al.*, 2005a; Blanco *et al.*, 2006), y muy similar a encontrada en el presente estudio. RimA y RimB en sama roquera también mostraron heterocigosidades medias esperadas altas además de unas probabilidades de exclusión combinadas a priori muy altas. Aunque esta probabilidad parece estar sobreestimada si se compara con el porcentaje de asignación familiar real, como se hizo en dorada, ambos valores (la estimación teórica y el porcentaje de asignación real) convergen en un 100% a partir de siete marcadores microsatélites, sugiriendo similares resultados en las múltiplex de sama roquera.



#### 4. ESTIMAS DE HEREDABILIDADES, CORRELACIONES GENÉTICAS, E INTERACCIÓN GXE, BAJO CONDICIONES INDUSTRIALES, PARA CARACTERES DE CRECIMIENTO, CANAL Y CALIDAD EN DORADA (*Sparus auratus* L.)

A. Navarro, M.J. Zamorano, S. Hildebrandt, R. Ginés, C. Aguilera, J.M. Afonso. Estimates of heritabilities and genetic correlations for body composition traits and G x E interactions, in gilthead seabream (*Sparus auratus* L.). **Aquaculture (enviado)**.

A. Navarro, M.J. Zamorano, S. Hildebrandt, R. Ginés, C. Aguilera, J.M. Afonso, 2009. Estimates of heritabilities and genetic correlations for growth and carcass traits in gilthead seabream (*Sparus auratus* L.), under industrial conditions. **Aquaculture (aceptado)**.

A. Navarro, M.J. Zamorano, R. Ginés, S. Hildebrandt, D. Negrín, R. Badilla, C. Mazorra y J.M. Afonso, 2007. Preliminary estimates of heritabilities for flesh quality traits in gilthead seabream (*Sparus auratus* L.). **Aquaculture Europe'07**. Octubre 2007, Istanbul, Turkey.

A. Navarro, M.J. Zamorano, M.A. Pérez-Cabal, O. González-Recio, C. Mazorra, R. Ginés, y J.M. Afonso, 2006. Estimaciones preliminares de heredabilidades para caracteres de crecimiento en dorada (*Sparus auratus* L.). ITEA 102, 110-114. XIII Reunión Nacional de Mejora Genética Animal, Junio 2006, Gijón, Asturias.



## 4.1. INTRODUCCIÓN

---

El crecimiento y consolidación de la industria de dorada (*Sparus auratus* L.) ha venido acompañado por una estabilización en los precios de mercado en los últimos cuatro años, aumentando con ello la competitividad de las empresas que se vuelcan en intensificar su cultivo, minimizar costes y/o dar un valor añadido a su producto. Para llevarlo a cabo, las empresas realizan distintas actuaciones alrededor de la alimentación, del manejo de los lotes, de la prevención de enfermedades e incluso de la ubicación de sus instalaciones. Sin embargo, actualmente, a nivel industrial, son escasas las estrategias que impliquen programas de mejora genética. El objetivo de un programa de mejora es el incremento simultáneo de varios caracteres de interés, ponderando cada uno de ellos por su respectivo valor económico. En acuicultura suelen tenerse en cuenta el crecimiento, la edad a la madurez sexual, la resistencia a enfermedades y la calidad del pez y de la carne (López-Fanjul y Toro, 2007).

Para las empresas de dorada el factor de conversión del alimento es el carácter más importante, representando alrededor del 40% del coste de la producción (Jover, 2007). En condiciones industriales, este carácter es difícil o imposible de medir, por lo que es mejorado a través del peso o la longitud a una edad determinada. La morfología, la cual queda reflejada por la compacidad, es también un carácter económicamente relevante ya que tiene influencia en la depreciación de especies que son comercializadas como pez entero (Elvingson y Johansson, 1993), como es el caso de la dorada. Sin embargo, se están abriendo nuevas vías de comercialización en dorada, a través de la industria del pescado fileteado (Luna, 2006), por lo que los caracteres de la canal están cobrando cada vez más importancia.

Por otro lado, los consumidores de pescado muestran un interés creciente por productos de calidad a la vez que no están dispuestos a pagar un precio excesivo por ellos (Gjedrem, 1997). Esto, unido a la competitividad de las empresas, está haciendo más relevantes los caracteres de calidad. En este sentido la composición del músculo juega un papel principal a través de atributos de calidad como son el sabor, la jugosidad, la textura y la apariencia. El sabor y la jugosidad están alta y positivamente correlacionados con el contenido de grasa en el músculo (Grigorakis, 2007). La fracción lipídica es el componente que presenta una mayor variación, más aun cuando se trata de una especie grasa, o una semigrasa en las que su contenido graso varía entre el 3-15% (Zamil *et al.*, 1992), como es el caso de la dorada. La variación en el porcentaje de grasa se refleja en el porcentaje de agua dado que la grasa y el agua normalmente constituyen el 80% del filete. Por lo que a mayor grasa menor humedad pero mayor jugosidad (Grigorakis, 2007). Los lípidos, en peces cultivados, tienden a aumentar con el peso del pez (Weatherley y Gill, 1983; Zhang *et al.*, 1994) pero también son afectados por el ciclo vital y la dieta, mientras que el porcentaje de proteína y cenizas parecen no depender del peso. De las proteínas, el 3-10% es colágeno, que forma el principal tejido conectivo entre las células y está relacionado con la textura en el filete, siendo más blandos los de menor contenido en colágeno (Hatae *et al.*, 1986). El contenido de colágeno presenta una correlación positiva y significativa con la firmeza de la carne cruda (Hatae *et al.*, 1986). De la misma manera, los peces de menor contenido en colágeno, cuando son cocinados, son más fibrosos, secos y de menor elasticidad, a diferencia de la de mayor cantidad de colágeno que tras ser cocinados presentan una textura tierna, succulenta y elástica, por lo que la textura del pez cocinado está afectada por la gelatina derivada del colágeno muscular que se forma en el tratamiento de

cocción (Sato *et al.*, 1986). Otro aspecto importante de la calidad, es la grasa concentrada dentro de la cavidad visceral, ya que afecta negativamente a la impresión del consumidor sobre el pescado, jugando un papel notable en el sentido visual. Una fuerte característica no muy buena como un olor fuerte suele proceder a menudo de la grasa visceral en los peces de acuicultura (Grigorakis, 2007). También significa energía que se deshecha, ya que cuando los peces son eviscerados, la grasa visceral es retirada junto con el tracto intestinal.

Todos estos caracteres están influenciados por factores ambientales tales como abióticos (Ginés *et al.*, 2004), nutricionales (Izquierdo *et al.*, 2003, 2005) o asociados a las condiciones de cultivo y de cría (Robaina *et al.*, 1997; Grigorakis *et al.*, 2002; Navarro *et al.*, 2004), pudiéndose mejorar mediante prácticas adecuadas de alimentación y cultivo de los peces. No obstante, la determinación genética de parte de la variación fenotípica permite mejorarlos de manera estable y acumulable. Al mismo tiempo, si las empresas utilizan diferentes sistemas de producción o distintas ubicaciones para el engorde, es útil estimar también las interacciones genotipo x ambiente (GxA), ya que éstas pueden limitar o incluso perjudicar el progreso genético (Saillant *et al.*, 2006; Dupont-Nivet *et al.*, 2008). En este sentido, en diferentes especies de acuicultura, existen actualmente implantados programas de mejora genética con importantes progresos genéticos en la tasa de crecimiento (Gjedrem, 1997; Gjedrem y Thodesen, 2005), a la vez que han sido descritas estimaciones de parámetros genéticos para caracteres de la canal y de calidad (Gjedrem y Olesen, 2005).

Sin embargo, para dorada, no existen prácticamente estimas de parámetros genéticos, salvo la de Knibb *et al.* (1997), que obtuvieron una heredabilidad realizada para el peso al sacrificio, estimada a partir de la

respuesta a una selección masal después de una generación, la heredabilidad para el cortisol plasmático post-estrés de confinamiento mediante cruces familiares por Montero *et al.* (2001) y la estimada, a escala experimental, para las deformidades de lordosis y opérculo, por Castro *et al.* (2008). Esto es debido en parte, a las características reproductivas de la especie, ya que para asegurar la calidad y volumen de sus alevines, la empresa realiza puestas masales a partir de lotes de 40 ó 60 reproductores (Brown *et al.*, 2005b). Desde el punto de vista genético, dicha estrategia tiene la ventaja de que reduce las fuentes de parecido entre los miembros de las familias (Herbinger *et al.*, 1999), pero presenta el inconveniente de que se desconocen las relaciones familiares de los peces bajo cultivo, lo que es un requisito esencial para estimar parámetros genéticos.

Por consiguiente, en especies con este tipo de producciones, para la implementación de un programa de mejora a nivel industrial, es necesaria la identificación de todos los peces implicados mediante marcaje físico y caracterización genética (Wesmajervi *et al.*, 2006). En dorada, es posible la identificación física a talla muy pequeña mediante el sistema de marcaje PIT (Navarro *et al.*, 2006) y la reconstrucción de las relaciones familiares mediante marcadores microsatélites combinados en múltiplex PCR lo que reduce los costes y garantiza su eficacia (Navarro *et al.*, 2008).

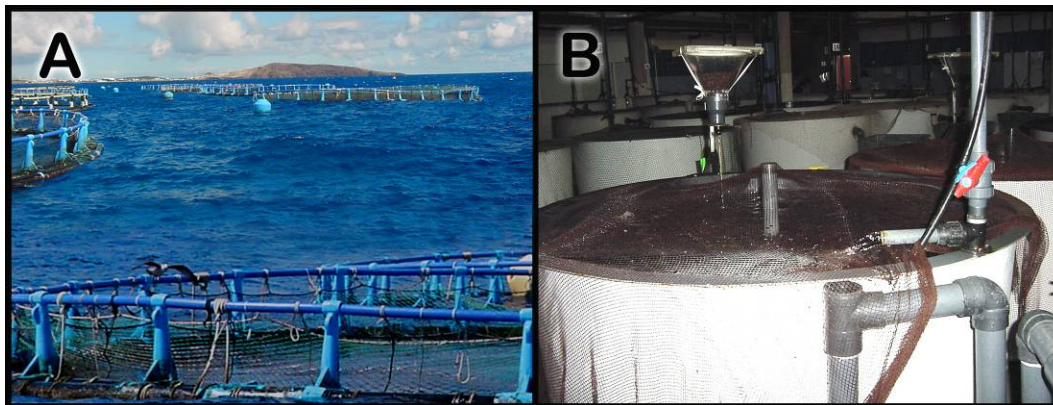
El objetivo del presente trabajo es estimar por primera vez para dorada y bajo condiciones industriales, heredabilidades y correlaciones genéticas para caracteres de crecimiento, de la canal y de calidad, y sus interacciones GxA, a partir de descendientes criados en dos sistemas de producción diferentes (jaulas y tanques), combinando marcajes físicos con marcadores moleculares.



## 4.2. MATERIALES Y MÉTODOS

### 4.2.1. Material biológico

En febrero del 2003, un lote de huevos procedentes del stock de reproductores de la empresa Tinamenor SA (San Vicente de la Barquera, Cantabria, España) fue sembrado en las instalaciones de cría del Instituto Canario de Ciencias Marinas (ICCM, Gran Canaria, España), y su cultivo y cría fue llevado a cabo según las condiciones descritas por Roo *et al.* (1999). A la edad de 130 días post-hatching (julio,  $4,8 \pm 0,1$  g) (media  $\pm$  error típico), los alevines, los cuales no fueron cribados debido a la calidad del lote (Afonso y Roo, 2007), se llevaron a la empresa Playa de Vargas 2001 S.L. (estación PLV2001, Gran Canaria, España) (Figura 10a), excepto una muestra de 472 peces que permaneció en las instalaciones de engorde del ICCM (estación ICCM) (Figura 10b).



**Figura 10:** Instalaciones de engorde de los peces. **A:** Empresa Playa de Vargas 2001 S.L. (jaulas). **B:** Instituto Canario de Ciencias Marinas (tanques).

A esta edad, los peces que permanecieron en el ICCM, se marcaron individualmente con *Passive Integrated Transponder* (PIT; Trovan Daimler-Benz), en la cavidad abdominal, siguiendo el protocolo de marcaje descrito en el segundo capítulo de este documento (Navarro *et al.*, 2006), y se repartieron en tres tanques de 1000 l donde fueron engordados bajo condiciones intensivas hasta alcanzar la talla comercial. El reparto del alimento se realizó mediante comederos de autodemanda utilizando piensos comerciales (Proaqua S.A., Dueñas-Palencia, España). La temperatura del agua osciló entre los  $19,32\pm 0,07^{\circ}\text{C}$  en marzo y los  $24,97\pm 0,08^{\circ}\text{C}$  en septiembre. El oxígeno disuelto y el flujo del agua fueron de  $5,98\pm 0,01$  ppm y de  $21\text{ l min}^{-1}$ , respectivamente. Las densidades variaron desde  $2,26\pm 0,08\text{ kg m}^{-3}$  y  $35,01\pm 1,74\text{ kg m}^{-3}$  al inicio y al final del experimento, respectivamente. Mensualmente los peces fueron identificados, pesados y medidos (longitud forquial). Tres de estos puntos de muestreo coincidieron con edades comercialmente importantes. Las edades de 130 y 165 días post-hatching son edades aproximadas de venta de alevines (2-20g) de las empresas de cría a las de engorde. Además, la edad de 165 días es la última a la que las empresas realizan la reordenación de sus lotes de engorde por tamaños y/o criba de deformes. A la edad de 330 días post-hatching, que se correspondió con la estación reproductiva (enero), es cuando existe una maduración sexual incipiente (Zohar *et al.*, 1978; Micale y Perdichizzi, 1990) que puede interferir negativamente sobre el crecimiento (Ginés *et al.*, 2003).

Los peces de las instalaciones de la empresa PLV2001 fueron engordados en una jaula y alimentados con piensos comerciales (Proaqua S.A., Dueñas-Palencia, España y BioMar A/S, Brande, Dinamarca), con una tasa de alimentación diaria de entre el 5,6% y 1% del peso del pez, hasta alcanzar la talla comercial. Las densidades variaron de  $1\text{ kg m}^{-3}$  en el periodo de cría a  $25\text{ kg m}^{-3}$  al

final del periodo de engorde, y el oxígeno disuelto en el agua tuvo un valor medio de 7 ppm.

A la edad de 509 días post-hatching, talla comercial (final de julio, 300-500 Kg), los peces engordados en el ICCM (472 peces) y una muestra de los engordados en PLV2001 (395 peces) fueron sacrificados y muestreados.

### ***4.2.2. Caracteres analizados***

#### ***Caracteres de crecimiento:***

- \* **Peso**
- \* **Longitud forquial:** Longitud del pez medida en línea recta desde el extremo distal de la mandíbula inferior hasta el radio central (horquilla) de la aleta caudal.
- \* **Compacidad:** Relación entre el peso y la longitud calculado como sigue:  $100 \times \text{peso} \times \text{longitud forquial}^{-3}$

#### ***Caracteres de la canal:***

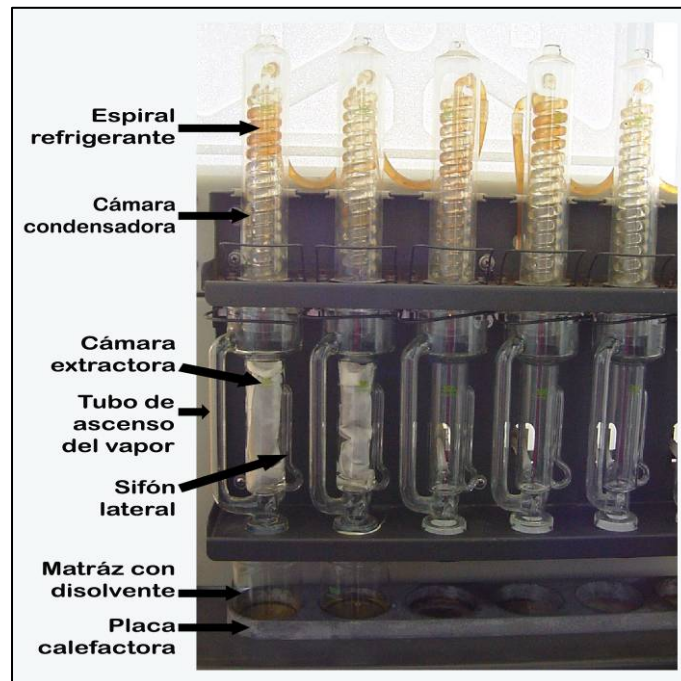
- \* **Peso canal:** Peso de el pez una vez eviscerado manualmente (incluyendo el riñón) y secado.
- \* **Rendimiento canal:** Peso canal expresado como porcentaje del peso del pez sin eviscerar ( $100 \times \text{peso canal} \times \text{peso pez}^{-1}$ ).
- \* **Peso filete:** Peso de los filetes de ambas caras del pez, tras haberle quitado la piel al pez y haberlo fileteado manualmente sin incluir ni el lomo y ni la ventresca.

- \* **Rendimiento filete:** Peso filete expresado como porcentaje del peso del pez sin eviscerar ( $100 \times \text{peso filete} \times \text{peso pez}^{-1}$ ).

### ***Caracteres de calidad:***

- \* **Grasa Visceral:** Peso de toda la grasa que se encontró dentro de la cavidad visceral del pez, la cual se separó manualmente de las vísceras, expresada como porcentaje del peso del pez ( $100 \times \text{peso grasa visceral} \times \text{peso pez}^{-1}$ ).
- \* Después de pesados los filetes, se envasaron al vacío y se congelaron a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta el análisis de la **composición de la carne**, en el que se estudiaron los caracteres descritos a continuación y realizados en ese orden. En todos los casos, el análisis se realizó por duplicado tomándose la media como resultado definitivo.
  - **Humedad:** Se molió una muestra del filete, se introdujo en un crisol y se secó en la estufa a  $105^{\circ}\text{C}$  durante 24 horas. Hasta su pesado se mantuvo en el desecador. La cantidad de humedad se expresó como porcentaje de carne húmeda.
  - **Cenizas:** El crisol en el que se midió la humedad, se introdujo en la mufla donde fue incinerada a  $600^{\circ}\text{C}$  durante 5 horas. Hasta su pesado se mantuvo en el desecador. La cantidad de cenizas se expresó como porcentaje de carne húmeda.
  - **Grasa muscular:** A partir de otra muestra molida del filete envuelta en un paquete hecho con papel *watman* se determinó la cantidad de grasa mediante el método Soxhlet (Figura 11). Hasta su pesado se mantuvo en el desecador. La cantidad de grasa se expresó como porcentaje de carne húmeda. Este método consiste

básicamente en el lavado sucesivo de la mezcla sólida con un determinado solvente (éter de petróleo), que va “lavando o extrayendo” de la mezcla, los componentes más solubles en él (grasa). La muestra sólida previamente homogeneizada y seca, se coloca en un paquete de material poroso que se sitúa en la cámara extractora del soxhlet. La placa calefactora calienta el disolvente extractante situado en el matraz llevándolo a ebullición. El vapor sube por un tubo y entra en la cámara condensadora. Al entrar en contacto con la espiral refrigerante cae gota a gota en la cámara extractora sobre el cartucho que contiene la muestra, extrayendo



**Figura 11:** Soxhlet utilizado para extraer la grasa del filete mediante lavados con éter de petróleo.

la grasa. Cuando el nivel del disolvente condensado en la cámara alcanza la parte superior del sifón lateral, el disolvente, con la grasa disuelta, asciende por el sifón y retorna al matraz. Este proceso se repite hasta que se completa la extracción de la grasa total de la muestra y se concentra en el disolvente.

- **Colágeno:** A partir de otra muestra molida del filete, se analizó la cantidad de colágeno siguiendo el método descrito por Palka (1999), basado en la determinación de la cantidad de hidroxiprolina mediante valoración colorimétrica (Figura 12), previa hidrólisis en medio ácido de las proteínas y oxidación de la hidroxiprolina. Puesto que la hidroxiprolina es un aminoácido abundante en el colágeno y poco frecuente en otras proteínas. Para convertir la cantidad de hidroxiprolina en colágeno, se utilizó el factor de 11,42 usado en dorada por Suárez *et al.* (2005). Se expresó como mg de colágeno por g de carne húmeda.



**Figura 12:** Reacción colorimétrica de la hidroxiprolina previa medición en el espectrofotómetro. En la gradilla los estándares y en la placa las muestras y los estándares.

### **4.2.3. Genotipado y asignación parental**

Tanto los 867 descendientes engordados en las dos estaciones, como los 66 reproductores de los que provenían fueron caracterizados genéticamente con la múltiplex RimA de nueve marcadores microsatélites diseñada y evaluada para dorada por Navarro *et al.* (2008). La extracción de ADN, la evaluación de éste, las condiciones de amplificación de la PCR y la carrera y lectura de los marcadores microsatélites, han sido por tanto, las mismas que las descritas en el tercer capítulo del presente documento.

Las asignaciones familiares (padre-madre-hijo) en las muestras de dorada, se determinaron usando el método de exclusión, teniendo en cuenta que el sexo de los reproductores era desconocido, mediante un programa no comercial escrito en lenguaje FORTRAN cedido por Dr. J. Fernández (INIA-Madrid, España).

### **4.2.4. Análisis de los datos**

Todos los datos, previamente comprobada su normalidad y su homogeneidad de varianzas, se analizaron aplicando un modelo lineal general, para detectar la significación del efecto tanque y estación utilizando el programa SPSS (v 13.0) (SPSS, Chicago, IL, EE.UU.). En el caso de las variables de calidad, fue necesaria la transformación logarítmica.

La repetibilidad de los análisis de la composición de la carne fue calculada, usando el programa SPSS (v 13.0), mediante el siguiente modelo lineal:

$$Y_{ij} = \mu + F_i + \varepsilon_{ij}$$

Donde  $Y$  es el dato del pez,  $\mu$  es la media de la población,  $F_i$  es el efecto fijo de la réplica y  $\varepsilon_{ij}$  es el error residual.

Las componentes de varianza de todos los caracteres considerados en este estudio se estimaron por restricción de máxima verosimilitud (REML) utilizando el programa VCE (v 5.1.2) (Kovač *et al.*, 2002) mediante el siguiente modelo lineal:

$$y = X\beta + Zu + \varepsilon$$

Donde  $y$  es el dato del carácter,  $\beta$  los efectos fijos (estación y tanque),  $u$  es el efecto animal aleatorio y  $\varepsilon$  el error residual.

Las magnitudes de las estimas de las heredabilidades se establecieron siguiendo la clasificación de Cardellino y Rovira (1987), en la que se consideran bajas entre 0,05 y 0,15, medias entre 0,20 y 0,40, altas entre 0,45 y 0,60 y muy altas las mayores de 0,65. Respecto a las correlaciones se clasificaron como bajas (0-0,40), medias (0,45-0,55) y altas (0,60-1), independientemente del signo.

Las interacciones genotipo x ambiente (GxA) se estimaron a través de dos métodos:

**Método I:** Mediante el siguiente modelo lineal utilizando el programa SPSS (v 13.0):

$$y = \mu + \alpha_i + \beta_j + \delta_{ij} + \varepsilon_{ijk}$$



Donde  $y$  es el dato fenotípico de cada carácter,  $\mu$  es la media de la población,  $\alpha_i$  es la familia,  $\beta_j$  es la estación,  $\delta_{ij}$  es la interacción entre la familia y la estación y  $\varepsilon_{ijk}$  es el error residual.

**Método II:** Mediante la estimación de la correlación genética entre un carácter en la estación ICCM y el mismo carácter en la otra estación PLV2001, usando el programa VCE (v 5.1.2). Tomando como medidas del carácter las medias familiares en cada estación.

### **4.3.1. Genotipado y asignación parental**

Cada uno de 867 descendientes fue asignado a un padre y una madre (100% de éxito en la asignación parental), usando el método de exclusión tolerando un error. Tras revisar los genotipos todos los errores fueron identificados como alelos nulos, los cuales sólo estuvieron presentes en el marcador *PbMS2*. Dentro de los reproductores estos alelos nulos mostraron una frecuencia muy similar a la de los descendientes (5,36% vs 5,07%), como era de esperar en equilibrio de Hardy-Weinberg, lo que revela que no hubo mutaciones en la segregación familiar. De los 66 reproductores que constituyeron el lote, sólo 28 contribuyeron en la puesta, 17 hembras y 11 machos, a pesar de que esta fue recogida, a priori, en el periodo intermedio de la misma (día 55 de puesta), formándose un total de 89 familias de hermanos carnales (ocho familias de medios hermanos paternos y 16 familias de medios hermanos maternos), con un rango de entre 1 y 53 descendientes por familia y una media de 9,7.

### **4.3.2. Resultados fenotípicos**

#### ***Caracteres de crecimiento y de la canal:***

A la edad inicial de 130 días, tanto los peces enviados a la empresa PLV2001 como los que permanecieron en las instalaciones del ICCM mostraron los mismos valores para el peso, la longitud y la compacidad. En la Tabla 10 se

muestran los resultados fenotípicos de las variables de crecimiento (peso, longitud y compacidad), a las edades de 130, 165 y 330 días, de los peces engordados en las instalaciones del ICCM. El efecto tanque sólo fue significativo ( $P < 0,05$ ) a la edad intermedia de 330 días debido a un tanque que mostró una media inferior al resto y aparentemente por una caída del nivel de oxígeno y/o caudal de agua durante ese pequeño periodo del engorde, que una vez subsanado desapareció en los sucesivos muestreos mensuales realizados (datos no mostrados). En la Tabla 11 se muestran los resultados de los caracteres de crecimiento y de la canal de los peces de ambas instalaciones a talla comercial (509 días), en la que no se encontró efecto significativo del tanque pero sí de la estación ( $P < 0,05$ ) sobre todos los caracteres. Como se puede apreciar, todos los valores fueron mayores en los peces engordados en la empresa PLV2001 que en las instalaciones del ICCM, salvo en el rendimiento canal, que ocurrió lo contrario. A esta edad, todos los peces resultaron inmaduros.

**Tabla 10:** Peso, longitud forquial, compacidad (media  $\pm$  error típico) y sus coeficientes de variación (CV) a diferentes edades (días post-hatching) de doradas engordadas en las instalaciones del Instituto Canario de Ciencias Marinas.

| Edades | Peso (g)          | Longitud (cm)    | Compac. ( $\text{g cm}^{-3}$ ) | CV Peso (%) | CV Long. (%) | CV Compac (%) |
|--------|-------------------|------------------|--------------------------------|-------------|--------------|---------------|
| 130    | 4,85 $\pm$ 0,06   | 6,63 $\pm$ 0,03  | 1,64 $\pm$ 0,01                | 23,18       | 7,26         | 9,19          |
| 165    | 20,68 $\pm$ 0,24  | 10,44 $\pm$ 0,04 | 1,79 $\pm$ 0,01                | 21,31       | 6,67         | 7,74          |
| 330    | 188,15 $\pm$ 1,68 | 20,49 $\pm$ 0,05 | 2,17 $\pm$ 0,01                | 16,29       | 4,71         | 7,74          |

**Tabla 11:** Resultados fenotípicos y coeficientes de variación (CV) de las variables de crecimiento, de la canal y de calidad (media  $\pm$  error típico), al sacrificio (509 días de edad), de doradas engordadas en las dos estaciones (valores de cada estación y la media total).

| Carácter                         | ICCM              | PLV2001           | Total             | CV (%) |
|----------------------------------|-------------------|-------------------|-------------------|--------|
| Peso (g)                         | 365,45 $\pm$ 3,25 | 485,58 $\pm$ 3,57 | 419,75 $\pm$ 3,14 | 16,24  |
| Longitud forquial (cm)           | 25,40 $\pm$ 0,07  | 27,66 $\pm$ 0,07  | 26,42 $\pm$ 0,06  | 5,14   |
| Compacidad (g cm <sup>-3</sup> ) | 2,21 $\pm$ 0,01   | 2,28 $\pm$ 0,01   | 2,24 $\pm$ 0,01   | 6,95   |
| Peso canal (g)                   | 329,27 $\pm$ 2,98 | 438,81 $\pm$ 3,10 | 381,78 $\pm$ 2,87 | 15,34  |
| Peso filete (g)                  | 124,64 $\pm$ 1,24 | 172,80 $\pm$ 1,29 | 147,72 $\pm$ 1,23 | 16,86  |
| Rendimiento canal (%)            | 92,98 $\pm$ 0,07  | 90,37 $\pm$ 0,07  | 91,73 $\pm$ 0,07  | 1,62   |
| Rendimiento filete (%)           | 35,11 $\pm$ 0,11  | 35,65 $\pm$ 0,14  | 35,37 $\pm$ 0,10  | 7,99   |
| Grasa visceral (%)               | 1,98 $\pm$ 0,05   | 2,64 $\pm$ 0,05   | 2,30 $\pm$ 0,04   | 44,56  |
| Grasa muscular (%)               | 7,40 $\pm$ 0,10   | 10,90 $\pm$ 0,10  | 9,08 $\pm$ 0,09   | 21,61  |
| Humedad (%)                      | 70,57 $\pm$ 0,09  | 67,60 $\pm$ 0,09  | 69,14 $\pm$ 0,08  | 2,65   |
| Ceniza (%)                       | 1,51 $\pm$ 0,01   | 1,42 $\pm$ 0,01   | 1,47 $\pm$ 0,00   | 9,17   |
| Colágeno (mg/g)                  | 0,68 $\pm$ 0,01   | 0,39 $\pm$ 0,01   | 0,54 $\pm$ 0,01   | 37,07  |

ICCM: Instituto Canario de Ciencias Marinas, PLV2001: Playa de Vargas2001S.L.

Los coeficientes de variación de las variables de crecimiento se muestran en la Tabla 10 a las edades de 130, 165 y 330 días y en la Tabla 11 al sacrificio. Como se puede apreciar, los coeficientes de variación del peso, independientemente de la edad, fueron al menos tres veces superiores a la longitud y dos veces superiores a la compacidad. Para el peso canal y peso filete los coeficientes de variación fueron similares a los del peso al sacrificio, mientras que para el rendimiento canal y rendimiento filete fueron bajos.

### ***Caracteres de calidad:***

En la Tabla 11 se muestran los resultados fenotípicos y los coeficientes de variación de los caracteres de calidad (grasa visceral, grasa muscular, humedad, ceniza y colágeno) de los peces de ambas instalaciones a talla comercial (509 días), en la que, al igual que ocurrió con las demás variables, se encontró un efecto significativo de la estación ( $P < 0,05$ ), excepto para el colágeno ( $P = 0,06$ ). Los peces engordados en la empresa PLV2001 mostraron valores mayores para grasa visceral y grasa muscular que los de las instalaciones del ICCM y menores para la humedad, ceniza y colágeno. Respecto a los coeficientes de variación, la grasa muscular mostró el valor más alto, mientras que los caracteres de composición de la carne mostraron valores comprendidos entre 2,7 y 37,1. En la Tabla 12 se muestran los valores de repetibilidad y coeficientes de variación entre réplicas para cada variable de composición de la carne. Como se puede observar, todas las correlaciones fueron significativas y mayores del 50%, y todos los coeficientes de variación entre réplicas mostraron valores más bajos que entre muestras (Tabla 11), todo lo cual sugiere una alta repetibilidad de los caracteres.

**Tabla 12:** Repetibilidad y coeficientes de variación entre réplicas para cada variable de composición de la carne.

| Variable       | Correlación | CV (%) |
|----------------|-------------|--------|
| Grasa muscular | 0,97**      | 3,12   |
| Humedad        | 0,99**      | 0,29   |
| Ceniza         | 0,59**      | 4,94   |
| Colágeno       | 0,85**      | 14,12  |

\*\* P<0,01

### ***4.3.3. Heredabilidades y correlaciones***

Las correlaciones fenotípicas y genéticas entre los caracteres de crecimiento a las edades de 130, 165, 330 y 509 días, y sus heredabilidades, se muestran en la Tabla 13. Como se puede observar, las heredabilidades estuvieron comprendidas entre 0,28 y 0,34 para el peso, entre 0,27 y 0,35 para la longitud y entre 0,05 y 0,13 para la compacidad. Como cabría esperar en cada una de las edades, las correlaciones entre el peso y la longitud fueron cercanas a la unidad, entre 0,96 y 0,99 para las correlaciones genéticas, y entre 0,87 y 0,93 para las correlaciones fenotípicas. Las correlaciones entre pesos y entre longitudes fueron altas entre edades consecutivas, si bien dichas estimas decrecieron en magnitud a medida que incrementó la diferencia entre las edades, siendo las correlaciones fenotípicas, como promedio, superiores a las genéticas. De manera similar, las

correlaciones de la compacidad, también decrecieron con el incremento de la edad, sin embargo las correlaciones fenotípicas fueron más bajas que las genéticas. En la tabla 14 se muestran las correlaciones fenotípicas y genéticas entre los caracteres de crecimiento, de la canal y de calidad, y sus heredabilidades, sólo a talla de sacrificio (509 días de edad). Respecto a las heredabilidades, las estimas estuvieron comprendidas entre 0,12 y 0,31 para los caracteres de la canal, 0,50 para la grasa visceral y entre 0,02 y 0,09 para las variables de composición de la carne. Para los caracteres de la canal, considerados como porcentajes, sus correlaciones con los caracteres de crecimiento (peso, longitud y compacidad) fueron esencialmente negativas (salvo el rendimiento filete vs compacidad), siendo bajas las fenotípicas y medias las genéticas. En el caso del rendimiento canal, las correlaciones genéticas fueron, en general, poco consistentes debido a sus grandes errores típicos. Sin embargo, para el peso canal y el peso filete sus correlaciones fenotípicas y genéticas con los caracteres de crecimiento fueron altas y positivas. En relación a las correlaciones genéticas y fenotípicas entre los caracteres de calidad, éstas fueron generalmente bajas, excepto entre humedad vs grasa muscular que fueron altas y negativas. En el caso concreto del colágeno, sus correlaciones genéticas fueron poco consistentes debido a sus grandes errores típicos. Respecto a las correlaciones entre los caracteres de calidad y los de crecimiento, las fenotípicas fueron siempre bajas, sin embargo las genéticas fueron en general bajas para el peso y la longitud y medias y altas para la compacidad. De las correlaciones entre los caracteres de la canal y los de calidad cabe destacar la alta y negativa correlación genética entre el rendimiento canal y la grasa visceral.

**Tabla 13:** Correlaciones fenotípicas (encima de la diagonal) y correlaciones genéticas (en cursiva debajo de la diagonal, con  $\pm$  error típico) entre peso, longitud (Long) y compacidad (FC) para dorada a diferentes edades. En la diagonal y en negrita las heredabilidades con  $\pm$  error típico.

|                           | Peso <sub>130</sub> | Long <sub>130</sub> | FC <sub>130</sub> | Peso <sub>165</sub> | Long <sub>165</sub> | FC <sub>165</sub> | Peso <sub>330</sub> | Long <sub>330</sub> | FC <sub>330</sub> | Peso <sub>509</sub> | Long <sub>509</sub> | FC <sub>509</sub> |
|---------------------------|---------------------|---------------------|-------------------|---------------------|---------------------|-------------------|---------------------|---------------------|-------------------|---------------------|---------------------|-------------------|
| <b>Peso<sub>130</sub></b> | <b>0,28±0,07</b>    | 0,92                | 0,31              | 0,87                | 0,83                | 0,20              | 0,55                | 0,46                | 0,26              | 0,39                | 0,35                | 0,12              |
| <b>Long<sub>130</sub></b> | <i>0,99±0,01</i>    | <b>0,31±0,07</b>    | 0,01              | 0,83                | 0,83                | 0,14              | 0,46                | 0,49                | 0,11              | 0,35                | 0,33                | 0,02              |
| <b>FC<sub>130</sub></b>   | <i>-0,43±0,69</i>   | <i>-0,23±0,20</i>   | <b>0,05±0,04</b>  | 0,23                | 0,14                | 0,20              | 0,19                | 0,05                | 0,40              | 0,12                | 0,00                | 0,25              |
| <b>Peso<sub>165</sub></b> | <i>0,97±0,02</i>    | <i>0,87±0,05</i>    | <i>0,20±0,16</i>  | <b>0,32±0,08</b>    | 0,93                | 0,36              | 0,66                | 0,58                | 0,31              | 0,46                | 0,41                | 0,15              |
| <b>Long<sub>165</sub></b> | <i>0,96±0,03</i>    | <i>0,95±0,03</i>    | <i>-0,24±0,67</i> | <i>0,98±0,01</i>    | <b>0,35±0,08</b>    | 0,08              | 0,60                | 0,59                | 0,24              | 0,37                | 0,40                | 0,02              |
| <b>FC<sub>165</sub></b>   | <i>-0,15±0,39</i>   | <i>-0,62±0,38</i>   | <i>0,88±0,14</i>  | <i>-0,11±0,38</i>   | <i>-0,24±0,26</i>   | <b>0,05±0,04</b>  | 0,24                | 0,06                | 0,38              | 0,28                | 0,12                | 0,35              |
| <b>Peso<sub>330</sub></b> | <i>0,36±0,17</i>    | <i>0,31±0,18</i>    | <i>-0,29±0,33</i> | <i>0,52±0,13</i>    | <i>0,44±0,15</i>    | <i>-0,13±0,35</i> | <b>0,31±0,07</b>    | 0,87                | 0,50              | 0,83                | 0,76                | 0,29              |
| <b>Long<sub>330</sub></b> | <i>0,33±0,15</i>    | <i>0,34±0,13</i>    | <i>-0,38±0,33</i> | <i>0,47±0,15</i>    | <i>0,52±0,11</i>    | <i>-0,44±0,27</i> | <i>0,96±0,02</i>    | <b>0,27±0,07</b>    | 0,08              | 0,73                | 0,80                | 0,04              |
| <b>FC<sub>330</sub></b>   | <i>0,10±0,31</i>    | <i>-0,08±0,28</i>   | <i>0,64±0,31</i>  | <i>0,35±0,22</i>    | <i>0,19±0,21</i>    | <i>0,93±0,09</i>  | <i>0,72±0,18</i>    | <i>0,58±0,28</i>    | <b>0,09±0,05</b>  | 0,40                | 0,20                | 0,53              |
| <b>Peso<sub>509</sub></b> | <i>0,11±0,15</i>    | <i>0,18±0,13</i>    | <i>-0,48±0,18</i> | <i>0,23±0,09</i>    | <i>0,11±0,12</i>    | <i>0,02±0,10</i>  | <i>0,93±0,04</i>    | <i>0,93±0,04</i>    | <i>0,65±0,18</i>  | <b>0,34±0,06</b>    | 0,91                | 0,31              |
| <b>Long<sub>509</sub></b> | <i>0,04±0,16</i>    | <i>0,11±0,18</i>    | <i>-0,69±0,23</i> | <i>0,18±0,18</i>    | <i>0,07±0,19</i>    | <i>-0,04±0,38</i> | <i>0,85±0,07</i>    | <i>0,93±0,05</i>    | <i>0,25±0,10</i>  | <i>0,97±0,01</i>    | <b>0,33±0,07</b>    | -0,09             |
| <b>FC<sub>509</sub></b>   | <i>0,14±0,21</i>    | <i>0,00±0,18</i>    | <i>0,82±0,32</i>  | <i>0,28±0,18</i>    | <i>0,13±0,20</i>    | <i>0,91±0,55</i>  | <i>0,67±0,12</i>    | <i>0,45±0,17</i>    | <i>0,98±0,01</i>  | <i>0,37±0,16</i>    | <i>0,01±0,19</i>    | <b>0,13±0,04</b>  |

Subíndice: Edad en días



**Tabla 14:** Correlaciones fenotípicas (encima de la diagonal) y correlaciones genéticas (en cursiva debajo de la diagonal, con  $\pm$  error típico) entre caracteres de crecimiento, de la canal y de calidad, para dorada a talla comercial (509 días de edad). En la diagonal y en negrita las heredabilidades con  $\pm$  error típico.

|                | Peso                             | Longitud                         | FC                               | Peso Canal                       | Peso Filete                      | Rend. Canal                      | Rend. Filete                     | Grasa Visceral                   | Grasa Muscular                   | Humedad                          | Ceniza                           | Colágeno                        |
|----------------|----------------------------------|----------------------------------|----------------------------------|----------------------------------|----------------------------------|----------------------------------|----------------------------------|----------------------------------|----------------------------------|----------------------------------|----------------------------------|---------------------------------|
| Peso           | <b>0,34<math>\pm</math>0,06</b>  | 0,91                             | 0,31                             | 0,99                             | 0,90                             | -0,07                            | 0,02                             | 0,13                             | 0,11                             | -0,21                            | 0,08                             | -0,04                           |
| Longitud       | <i>0,97<math>\pm</math>0,01</i>  | <b>0,33<math>\pm</math>0,07</b>  | -0,09                            | 0,92                             | 0,85                             | -0,01                            | 0,00                             | 0,09                             | 0,08                             | -0,16                            | 0,04                             | -0,07                           |
| FC             | <i>0,37<math>\pm</math>0,16</i>  | <i>0,01<math>\pm</math>0,19</i>  | <b>0,13<math>\pm</math>0,04</b>  | 0,27                             | 0,30                             | -0,13                            | 0,16                             | 0,14                             | 0,10                             | -0,15                            | 0,12                             | -0,01                           |
| Peso Canal     | <i>0,99<math>\pm</math>0,00</i>  | <i>0,97<math>\pm</math>0,01</i>  | <i>0,12<math>\pm</math>0,16</i>  | <b>0,26<math>\pm</math>0,06</b>  | 0,90                             | 0,04                             | 0,04                             | 0,07                             | 0,09                             | -0,19                            | 0,07                             | -0,07                           |
| Peso Filete    | <i>0,96<math>\pm</math>0,02</i>  | <i>0,93<math>\pm</math>0,03</i>  | <i>0,31<math>\pm</math>0,18</i>  | <i>0,94<math>\pm</math>0,03</i>  | <b>0,15<math>\pm</math>0,04</b>  | 0,03                             | 0,46                             | 0,08                             | 0,10                             | -0,18                            | 0,11                             | -0,09                           |
| Rend. Canal    | <i>0,02<math>\pm</math>0,18</i>  | <i>0,12<math>\pm</math>0,16</i>  | <i>-0,43<math>\pm</math>0,08</i> | <i>0,14<math>\pm</math>0,20</i>  | <i>0,14<math>\pm</math>0,23</i>  | <b>0,31<math>\pm</math>0,07</b>  | 0,18                             | -0,51                            | -0,11                            | 0,05                             | -0,08                            | 0,02                            |
| Rend. Filete   | <i>-0,59<math>\pm</math>0,19</i> | <i>-0,56<math>\pm</math>0,19</i> | <i>-0,01<math>\pm</math>0,21</i> | <i>-0,64<math>\pm</math>0,17</i> | <i>-0,38<math>\pm</math>0,26</i> | <i>-0,05<math>\pm</math>0,19</i> | <b>0,12<math>\pm</math>0,03</b>  | -0,05                            | -0,03                            | 0,06                             | 0,13                             | -0,04                           |
| Grasa Visceral | <i>0,08<math>\pm</math>0,16</i>  | <i>-0,09<math>\pm</math>0,17</i> | <i>0,69<math>\pm</math>0,12</i>  | <i>-0,05<math>\pm</math>0,17</i> | <i>0,03<math>\pm</math>0,03</i>  | <i>-0,92<math>\pm</math>0,04</i> | <i>-0,01<math>\pm</math>0,20</i> | <b>0,50<math>\pm</math>0,07</b>  | 0,07                             | -0,11                            | 0,12                             | -0,06                           |
| Grasa Muscular | <i>0,22<math>\pm</math>0,22</i>  | <i>0,16<math>\pm</math>0,21</i>  | <i>0,24<math>\pm</math>0,25</i>  | <i>0,06<math>\pm</math>0,22</i>  | <i>0,03<math>\pm</math>0,28</i>  | <i>-0,02<math>\pm</math>0,33</i> | <i>-0,11<math>\pm</math>0,22</i> | <i>0,01<math>\pm</math>0,26</i>  | <b>0,05<math>\pm</math>0,03</b>  | -0,68                            | -0,08                            | -0,31                           |
| Humedad        | <i>-0,39<math>\pm</math>0,18</i> | <i>-0,32<math>\pm</math>0,16</i> | <i>-0,43<math>\pm</math>0,13</i> | <i>-0,25<math>\pm</math>0,19</i> | <i>-0,30<math>\pm</math>0,11</i> | <i>-0,47<math>\pm</math>0,26</i> | <i>0,13<math>\pm</math>0,18</i>  | <i>0,13<math>\pm</math>0,23</i>  | <i>-0,99<math>\pm</math>0,02</i> | <b>0,09<math>\pm</math>0,03</b>  | 0,02                             | 0,29                            |
| Ceniza         | <i>0,01<math>\pm</math>0,16</i>  | <i>-0,07<math>\pm</math>0,14</i> | <i>0,59<math>\pm</math>0,18</i>  | <i>0,05<math>\pm</math>0,13</i>  | <i>0,05<math>\pm</math>0,24</i>  | <i>-0,42<math>\pm</math>0,20</i> | <i>-0,13<math>\pm</math>0,19</i> | <i>0,69<math>\pm</math>0,13</i>  | <i>0,01<math>\pm</math>0,22</i>  | <i>-0,12<math>\pm</math>0,28</i> | <b>0,08<math>\pm</math>0,03</b>  | 0,00                            |
| Colágeno       | <i>-0,02<math>\pm</math>0,30</i> | <i>0,78<math>\pm</math>0,44</i>  | <i>-0,89<math>\pm</math>0,16</i> | <i>0,48<math>\pm</math>0,49</i>  | <i>0,57<math>\pm</math>0,50</i>  | <i>0,16<math>\pm</math>0,41</i>  | <i>0,04<math>\pm</math>0,38</i>  | <i>-0,21<math>\pm</math>0,44</i> | <i>-0,27<math>\pm</math>0,44</i> | <i>0,55<math>\pm</math>0,19</i>  | <i>-0,12<math>\pm</math>0,46</i> | <b>0,02<math>\pm</math>0,01</b> |

#### **4.3.4. Interacción Genotipo x Ambiente**

De las 89 familias de hermanos carnales que formaron los 867 descendientes, 61 estuvieron representadas en las dos estaciones, las cuales se utilizaron para los análisis de la interacción genotipo x ambiente. Como se puede observar en la Tabla 15, a través del método I, todas las interacciones entre el efecto estación y el efecto familia no fueron significativas ( $P>0,05$ ), mostrando un p valor medio de 0,54. Respecto al método II, las correlaciones genéticas entre cada carácter medido en ambas estaciones, variaron entre 0,70 y 0,99 para los caracteres de crecimiento, entre 0,90 y 0,99 para los de la canal y entre 0,15 y 0,81 para los de calidad, con una media de 0,67, considerándolos todos.

**Tabla 15:** Interacciones genotipo x ambiente (p valor) y correlaciones genéticas entre las dos estaciones ( $\pm$  error típico) para cada carácter, en dorada a talla comercial (509 días de edad).

| Carácter           | P valor | Correlaciones genéticas |
|--------------------|---------|-------------------------|
| Peso               | 0,65    | 0,70 $\pm$ 0,10         |
| Longitud           | 0,39    | 0,70 $\pm$ 0,12         |
| Compacidad         | 0,98    | 0,99 $\pm$ 0,13         |
| Peso canal         | 0,09    | 0,90 $\pm$ 0,16         |
| Peso filete        | 0,08    | 0,94 $\pm$ 0,19         |
| Rendimiento canal  | 0,68    | 0,90 $\pm$ 0,18         |
| Rendimiento filete | 0,84    | 0,99 $\pm$ 0,05         |
| Grasa visceral     | 0,92    | 0,81 $\pm$ 0,22         |
| Grasa muscular     | 0,12    | 0,15 $\pm$ 0,94         |
| Humedad            | 0,07    | 0,22 $\pm$ 0,98         |
| Ceniza             | 0,96    | 0,27 $\pm$ 0,66         |
| Colágeno           | 0,74    | 0,51 $\pm$ 0,35         |

### **4.4.1. Genotipado y asignación parental**

La correcta inferencia de la genealogía en un programa de mejora genética es esencial a la hora de estimar los parámetros genéticos y los valores mejorantes de los reproductores (Dodds *et al.* 2005). Esto cobra especial importancia en especies con puesta masal como la dorada, donde las relaciones familiares han de determinarse mediante marcadores microsatélites. El poder de resolución de los microsatélites, como ya se explicó en el tercer capítulo del presente documento, depende del número de ellos utilizados, de sus polimorfismos, los errores de lectura, la presencia de alelos nulos, el número de reproductores que contribuyen en la puesta o el incremento de la homociguidad. De ahí que la asignación parental con el fin de obtener parámetros genéticos, en diferentes especies, mediante reacciones múltiplex de microsatélites haya sido descrita con diferentes grados de éxito (Fishback *et al.*, 2002; Saillant *et al.*, 2006, 2007; Dupont-Nivet *et al.*, 2008). En dorada, Castro *et al.* (2008) obtuvieron mediante 11 microsatélites en reacciones simples, un 100% de asignación, valor máximo que está en concordancia con el obtenido en nuestro estudio, el cual se obtuvo mediante una sola reacción múltiplex. El uso de reacciones múltiplex minimiza el número de errores y costes de genotipado (Navarro *et al.*, 2008), lo que posibilita el que puedan ser implementadas a escala industrial, como se ha puesto de manifiesto en el presente estudio donde se asignó el total de los 867 descendientes de un lote industrial de reproductores de sexo desconocido, y a pesar de los alelos nulos presentes en la población.

#### **4.4.2. Resultados fenotípicos**

##### ***Caracteres de crecimiento y de la canal:***

En dorada, los caracteres de crecimiento y de rendimiento son los más importantes desde el punto de vista económico, al igual que sucede en otras especies de peces de aptitud cárnica (Neira *et al.*, 2004; Saillant *et al.*, 2007; Dupont-Nivet *et al.*, 2008; Kause *et al.*, 2007; Kocour *et al.*, 2007; Powell *et al.*, 2008), con la particularidad de que cada una de ellas tiene definida distintas edades-pesos de interés comercial. En el caso particular de dorada su comercialización se lleva a cabo, fundamentalmente, entre las tallas de 350 – 500 g, la cual se alcanza a distintas edades dependiendo de las isotermas de crecimiento. En este sentido, en las Islas Canarias, Ginés *et al.* (2004) estudiaron el crecimiento durante 345 días, de doradas desde 25 g hasta talla comercial (400 g) y describieron que el efecto tanque durante todo el proceso de engorde no fue distinto de cero. Estos datos están en completa consonancia con los resultados de crecimiento del presente estudio, si bien hubo efecto significativo de la instalación sobre el crecimiento de los peces. Los valores más pequeños de la instalación del ICCM frente a la empresa PLV2001 fueron debidos, posiblemente, a las diferencias en densidad y nivel de saturación de oxígeno disuelto, en el último periodo del engorde. Respecto al rendimiento canal en dorada, Ginés (1997) obtuvo un valor del 92,4% al sacrificio, mientras que Oliva (2008) un 90,9% en una población de peces provenientes de la industria. Ambos engordes de dichos autores fueron llevados a cabo en las mismas condiciones de temperatura y geográficas, lo cual concuerda con los valores descritos en el presente estudio. En cuanto al rendimiento filete, Luna (2006) describió para dorada que éste es diferente dependiendo del sistema de fileteado empleado. A la talla de sacrificio,

sin considerar en el filete las zonas corporales del cogote y la ventresca, Oliva (2008) obtuvo valores del 41% y Luna (2006) del 49%, los cuales concuerdan con los resultados del presente estudio.

### ***Caracteres de calidad:***

Por demanda de los consumidores, los caracteres de calidad están cobrando cada vez más importancia en la industria de la acuicultura, y en ellos la composición del músculo juega un papel determinante (Gjedrem, 1997). En dorada de acuicultura el porcentaje de grasa descrito en músculo muestra una gran variación que oscila entre 3 y 11 % (Grigorakis, 2007) y mantiene una relación inversa con la humedad. Robaina *et al.* (1997), obtuvieron valores de grasa-humedad de 8,3-69,3 % y 9,8-68,1 % bajo diferentes dietas experimentales. Flos *et al.* (2002), describieron un efecto significativo de la densidad y el sistema de alimentación sobre las estimas de la grasa-humedad, con valores de 2,5-73,9 % para alta densidad y alimentación manual, y 5,9-71,7 % para baja densidad y alimentación mediante autodemanda. También en dorada, Ginés *et al.* (2004) obtuvieron valores de grasa-humedad estadísticamente diferentes de 5,5-70,9 % y 6,0-69,8 %, en peces criados bajo regimenes de fotoperiodo artificial y natural, respectivamente. A diferencia de la grasa, el porcentaje de ceniza en el músculo muestrea en dorada una escasa variación que está comprendida entre el 1,2 y 1,6 % (Grigorakis, 2007). Todos estos valores de grasa, humedad y ceniza están en concordancia con los resultados del presente estudio, no sólo por sus valores medios sino también por la relación inversa entre la grasa y la humedad. Respecto al porcentaje de colágeno total en el músculo, Sato *et al.* (1986), mediante el mismo método que el empleado en el presente estudio, describieron valores en 24 especies de peces que variaron entre 3,4 y 21,9 mg/g, debido al

efecto de la especie así como a factores dentro de especie como son la zona muscular, la estación al sacrificio, las condiciones nutricionales o la edad de los peces. En dorada, Suárez *et al.* (2005) estudiaron los cambios en el contenido de colágeno en el músculo tras horas de almacenamiento en hielo, describiendo un decrecimiento estadísticamente significativo con el mismo. Todos estos efectos están en concordancia con los resultados obtenidos en el presente estudio, en el cual los valores estimados fueron inferiores a aquellos ya que la cantidad de colágeno en músculo fue la última variable analizada, después de un periodo de almacenamiento.

Otro aspecto de la calidad del pez es la cantidad de grasa visceral (Gjedrem, 1997). Para dorada, aunque hay menos datos que para la composición del músculo, han sido descritos valores, expresados como porcentajes del peso del pez, de entre 0,8 a 3,0 % (Santinha *et al.*, 1999; Grigorakis *et al.*, 2002; Grigorakis y Alexis, 2005), los cuales están en concordancia con los encontrados en el presente estudio.

#### ***4.4.3. Heredabilidades y correlaciones***

##### ***Caracteres de crecimiento y de la canal:***

En especies consolidadas como salmón del Atlántico (*Salmo salar*), salmón coho (*Oncorhynchus kisutch*), trucha arcoiris (*Oncorhynchus mykiss*), carpa común (*Cyprinus carpio*), carpa asiática (*Labeo rohita*), tilapia del Nilo (*Oreochromis niloticus*) y pez gato (*Ictalurus punctatus*), existen programas de mejora genética con respuesta a la selección para la tasa de crecimiento (Gjedrem, 1997; Gjedrem

y Thodesen, 2005). Sin embargo, para su implementación es esencial conocer previamente el grado de determinación genética de los caracteres de interés comercial. Para caracteres de crecimiento en dorada, Knibb *et al.* (1997) estimaron heredabilidades realizadas para el peso al sacrificio después de una generación de selección divergente en dos sentidos, y en comparación a una línea control, las cuales mostraron valores de  $0,29 \pm 0,04$  para el aumento de peso y de  $0,51 \pm 0,13$  para la disminución. En el presente estudio, el peso, independientemente de la edad, mostró una heredabilidad promedio media-alta de  $0,31 \pm 0,07$  y al sacrificio de  $0,34 \pm 0,06$ , todo lo cual está en concordancia con los resultados de Knibb *et al.* (1997). Las estimas de este estudio se realizaron a partir de descendientes provenientes de un solo lote de reproductores, en donde la variancia y el porcentaje de la contribución parental están en concordancia con otros datos de puestas masales en dorada (Batargias *et al.*, 1997; Brown *et al.*, 2005b). Dado que la industria normalmente realiza las puestas a partir de más de un lote de reproductores, la heredabilidad estimada en el presente estudio sugiere que la diversidad genética de dorada puede ser aún mayor.

En el caso de la compacidad, se han descrito estimas medias-altas en juveniles de corvina roja (*Sciaenops ocellatus*) a distintas edades ( $0,28 - 0,47$ ) y en juveniles de carpa común de 8 semanas de edad ( $0,37 \pm 0,08$ ), por Saillant *et al.* (2007) y Vandeputte *et al.* (2004), respectivamente. Mientras que Dupont-Nivet *et al.* (2008), estimaron en lubina (*Dicentrarchus labrax*) de talla comercial un valor de  $0,19 \pm 0,04$ , el cual fue más bajo que el estimado para el peso y para la longitud ( $0,62 \pm 0,06$  y  $0,54 \pm 0,06$ , respectivamente). Estos últimos datos están en concordancia con las estimas del presente estudio, donde las bajas heredabilidades para la compacidad en comparación con otras especies puede ser explicado porque la dorada presenta, proporcionalmente, un mayor crecimiento

en peso que en longitud (Ginés, 1997) y porque en las Islas Canarias, los peces son inmaduros durante el periodo de crecimiento y a talla de sacrificio (Ginés *et al.*, 2004), sin afectarse la morfología.

En cuanto a los caracteres de la canal, la variación genética aditiva que ha sido descrita en distintas especies abarca desde valores bajos hasta muy altos. Para el caso de peso canal, en salmón del Atlántico, Powell *et al.* (2008) obtuvieron una estima muy alta,  $0,51\pm 0,06$ , mientras que en *black bream* (*Acanthopagrus butcheri*), trucha arcoiris y salmón coho, se han obtenido estimas medias (0,21-0,39) (Gjerde y Schaeffer, 1989; Kause *et al.*, 2002; Neira *et al.*, 2004; Doupé y Lymbery, 2005; Kause *et al.*, 2007), las cuales son muy parecidas a las estimadas en el presente estudio. En el caso del rendimiento canal, la variación es aún mayor, ya que mientras Powell *et al.* (2008) obtuvieron una determinación genética no distinta de cero ( $0,02\pm 0,03$ ), la obtenida por Kause *et al.* (2002) fue alta ( $0,45\pm 0,07$ ), la cual está más en concordancia con la heredabilidad de este estudio. En cuanto al peso filete y rendimiento filete, es notable la variación genética aditiva que ha sido descrita en distintas especies, si bien las heredabilidades estimadas para el rendimiento filete (0,03-0,33) han sido en general más bajas que para el peso filete (0,21-0,52) (Kause *et al.*, 2002; Neira *et al.*, 2004; Doupé y Lymbery, 2005; Rutten *et al.*, 2005; Kause *et al.*, 2007; Kocour *et al.*, 2007; Powel *et al.*, 2008). Los resultados del presente estudio también muestran heredabilidades inferiores para rendimiento filete frente al peso filete, y más bajas, como promedio, respecto a las mencionadas para otras especies, pero con magnitudes considerables para selección y muy similares a las descritas por Neira *et al.* (2004) dentro del programa de mejora Coyhaique del salmón coho ( $0,11\pm 0,05$  para el rendimiento filete y  $18\pm 0,07$  para el peso filete).



El peso y la longitud son caracteres que están genética y fenotípicamente correlacionados, como ha sido puesto de manifiesto en salmónidos o ciprínidos (Elvingson y Johansson, 1993; Winkelman y Peterson, 1994; Vandeputte et. al., 2008) o en la dorada, en el presente estudio, a cada edad. Al mismo tiempo, sus similares heredabilidades revelan que el peso y la longitud son criterios igualmente válidos que darían la misma respuesta a la selección, si bien la longitud parece ser un carácter más adecuado por su facilidad de medición en condiciones de campo (Vandeputte et. al., 2008), y porque es más repetible que el peso, como revela su menor coeficiente de variación. En este sentido, Frias *et al.* (1995) han demostrado la utilidad de usar la longitud, en vez del peso, en los índices de selección genética para salmón del Atlántico, tanto a talla de comercialización como de madurez sexual. Respecto a las correlaciones genéticas entre edades, es interesante estimarlas en el sentido de que permiten tomar decisiones para preseleccionar a talla temprana, dependiendo de la magnitud de las mismas. En general, como ha sido descrito en distintas especies, estas correlaciones son bajas (0,30-0,50) entre edades distantes (Myers *et al.*, 2001; Kolstad *et al.*, 2006; Vandeputte *et al.*, 2008). Esto concuerda con las correlaciones genéticas encontradas en nuestro estudio entre 130 y 165 días de edad respecto a la edad del sacrificio, sugiriendo que no sería apropiada una selección en fases tempranas del desarrollo de dorada, más aun teniendo en cuenta que dichas correlaciones han sido más bajas que las descritas por estos autores. Sin embargo, dichas estimas si podrían ser de utilidad para la construcción de índices de selección, tal y como Frias *et al.* (1995) propusieron, los cuales, con correlaciones genéticas entre los estadio de alevín y cosecha similares a las de este estudio, revelaron la importancia de usar información familiar a edades diferentes en los índices de selección a talla de mercado y de madurez sexual. Por el contrario, las

correlaciones genéticas entre edades cercanas al sacrificio suelen ser altas (0,60-0,80), como ha sido puesto de manifiesto en trucha arcoiris, entre 730 y 910 días (Elvingson y Johansson, 1993), en salmón chinook (*Oncorhynchus tshawytscha*), entre 270 y 660 días (Winkelman y Peterson, 1994) y en lubina, entre 341 y 818 días (Saillant *et al.*, 2006). Esto concuerda con las correlaciones genéticas del presente estudio entre 330 días y la talla de sacrificio entre pesos y longitudes. Del mismo modo, las correlaciones genéticas entre compacidades, aunque más altas, entre edades consecutivas son superiores que entre edades distantes, al igual que se ha encontrado en otras especies (Elvingson y Johansson, 1993; Fishback *et al.*, 2002; Saillant *et al.*, 2007).

La compacidad es un carácter que está genéticamente correlacionado con el peso y la longitud. En este sentido, se han descrito en diferentes especies valores negativos a tallas pequeñas y positivos a tallas grandes (Elvingson y Johansson, 1993; Fishback *et al.*, 2002; Vandeputte *et al.*, 2004), los cuales se corresponden con las correlaciones genéticas entre el peso y la longitud frente a la compacidad en las distintas edades. Más aún, la selección directa sobre la longitud al sacrificio en dorada, junto a la escasa correlación genética de ésta frente a la compacidad, tendría poco efecto sobre variaciones en la morfología del pez. Esto es una ventaja, ya que una variación en la conformación del pez, podría tener como consecuencia la desvalorización por parte del consumidor, en especies que son comercializadas como pez entero (Elvingson y Johansson, 1993).

Los caracteres de la canal están cobrando importancia frente a la comercialización como pez entero. De hecho en España, el porcentaje que supone el consumo de pescado fileteado frente al consumo total de pescado ha oscilado desde el 3,61% en 1993 al 6,27% en 2002 (Luna, 2006). Este autor, para el caso

particular de dorada, ha llevado a cabo un estudio exhaustivo sobre la demanda del filete de dorada en el mercado español, en el que pusieron de relieve que una estima de 11 €/kg (precio establecido según los empresarios, por costes, y los consumidores, por aceptación), incrementaría la demanda de dorada en más de 6.100 t/año. En este sentido, el conocimiento de las correlaciones genéticas entre caracteres de crecimiento y de la canal es de gran importancia a la hora de tomar decisiones en los procesos de selección genética. En el caso del peso canal y el peso filete, sus estimas frente al peso y la longitud son consistentes entre especies, siendo muy altas y positivas, como ha sido descrito en el presente estudio a la vez que en otras especies (Gjerde y Gjedrem, 1984; Kause *et al.*, 2002; Neira *et al.*, 2004; Doupé y Lymbery, 2005; Rutten *et al.*, 2005; Kause *et al.*, 2007; Kocour *et al.*, 2007; Powell *et al.*, 2008). En el caso del rendimiento canal y rendimiento filete, sus correlaciones con respecto al peso y la longitud han mostrado valores desde altas y positivas (Doupé y Lymbery, 2005; Rutten *et al.*, 2005; Kocour *et al.*, 2007), hasta cercanas a cero (Kause *et al.*, 2002, 2007). En el presente estudio, con respecto al peso y a la longitud, se obtuvieron también correlaciones no distintas de cero para el rendimiento canal mientras que para el rendimiento filete fueron negativas. Estos resultados ponen de relieve que en dorada el peso de la canal y del filete aumenta a medida que lo hacen el peso o la longitud de los peces, tanto desde el punto de vista fenotípico como genético, por las altas correlaciones. Por el contrario, los rendimientos de la canal y del filete son independientes de peso y la longitud, como denotan las correlaciones fenotípicas, pero no desde el punto de vista genético para el caso del rendimiento filete que es negativo. Este último dato parece sugerir que a largo plazo debe vigilarse el rendimiento en peces de alto crecimiento. En cualquier caso, parece adecuado, al menos inicialmente, que la mejora de los caracteres de la canal en

dorada quede a expensas de la selección directa para la longitud, teniendo en cuenta que la evaluación de la evaluación de estos caracteres presenta la desventaja de que es laboriosa, requiere de tecnificación, a la vez que del sacrificio de los peces (Kause *et al.*, 2007), mientras que la longitud se puede valorar de manera simple en condiciones de campo y permite examinar un mayor número de peces por unidad de tiempo, lo que a su vez permite ejercer una mayor intensidad de selección. Más aún, la magnitud y consistencia de las correlaciones del peso de la canal y del filete frente a la longitud predicen una mayor respuesta correlacionada para dichos caracteres que la respuesta directa.

### ***Caracteres de calidad:***

En relación a los caracteres de calidad en peces han sido descritos valores de heredabilidades muy diversos. De los caracteres de la composición de la carne, el más estudiado ha sido la grasa muscular. En salmónidos, han sido descritos valores fundamentalmente medios (0,16-0,30) (Iwamoto *et al.*, 1990; Rye y Gjerde, 1996; Kause *et al.*, 2002; Neira *et al.*, 2004; Vieira *et al.*, 2007; Powel *et al.*, 2008), pero también se han descrito valores altos (0,47) (Gjerde y Schaeffer, 1989) e incluso bajos (0-0,14) (Elvingson y Nilsson, 1994; Tobin *et al.*, 2006). En lubina, Haffray *et al.* (2007) obtuvieron estimas altas de heredabilidad (0,43-0,77), mientras que en el pez gato, El-Ibiary y Joyce (1978) obtuvieron una determinación genética aditiva baja (0-0,08), lo cual concuerda con las estimas del presente estudio para dorada. En el caso del porcentaje de humedad, las estimas de heredabilidad son también heterogéneas en las distintas especies en el que ha sido descrito. Así, mientras Iwamoto *et al.* (1990), Rye y Gjerde (1996) y Gjerde y Schaeffer (1989) obtuvieron valores medios (0,14-0,30), Elvingson y Nilsson (1994) obtuvieron valores bajos (0,11). Kause *et al.* (2002), en trucha arcoiris,

describieron valores bajos tanto para la humedad como para la ceniza (0,06), los cuales fueron de magnitud similar a los del presente trabajo para ambos caracteres. Para el colágeno, el cual es un reflejo de la textura de la carne (Hatae *et al.*, 1986), la heredabilidad de este estudio representa la primera estima descrita en peces, la cual fue baja. Por el contrario, la grasa visceral si mostró una componente genética aditiva grande, e incluso mayor que la descrita para otras especies, pero en general en concordancia con éstas (0,10-0,35) (Gjerde y Schaeffer, 1989; Rye y Gjerde, 1996; Kause *et al.*, 2002; Neira *et al.*, 2004).

A nivel fenotípico, la correlación positiva entre el peso del pez con la cantidad de grasa (muscular o visceral) ha sido ampliamente descrita, tanto en salmónidos (Gjedrem, 1997) como en dorada (Ginés *et al.*, 2004; Grigorakis y Alexis, 2005). En el caso de la grasa muscular con el crecimiento (peso o longitud), en salmón coho (Iwamoto *et al.*, 1990; Neira *et al.*, 2004) y en salmón del Atlántico (Powel *et al.*, 2008), se conserva el sentido de la correlación a nivel genético, siendo los valores descritos medios y altos (0,24-0,76). Contrariamente, en trucha arcoiris, Gjerde y Schaeffer (1989) y Kause *et al.* (2002) estimaron unos valores negativos (-0,19 y -0,12, respectivamente). Por otro lado, en salmónidos una correlación positiva es desfavorable debido a que son especies de alto contenido de grasa en el músculo, y niveles muy altos disminuyen la calidad de la carne (Powel *et al.*, 2008). Mientras que en dorada, un aumento del contenido graso del músculo mejora los atributos de la carne (Grikorakis, 2007), por lo que una correlación genética positiva encontrada entre los caracteres de la longitud y el porcentaje de grasa muscular favorecería indirectamente la mejora de la calidad de la carne a través del crecimiento. En el presente estudio, dicha correlación es positiva, si bien poco consistente debido a su error típico. En cuanto a los contenidos de grasa y humedad en el músculo, las correlaciones

fenotípicas y genéticas del presente estudio en dorada están en concordancia con las descritas para otras especies. En este sentido, Kause *et al.* (2002), en trucha arcoiris, y Iwamoto *et al.* (1990), en salmón coho, describieron unas correlaciones genéticas de -0,96 y -0,49, respectivamente. En relación a la textura de la carne, las estimas son escasas debido a la dificultad para medir la misma en un número representativo de peces en fresco (Gjedrem, 1997). No obstante, Neira *et al.* (2004) describieron una correlación alta y positiva de este carácter con el peso (0,30-0,70). Sin embargo, la textura puede ser valorada indirectamente a través de su relación con el colágeno, cuyo mayor contenido afecta positivamente tanto a la textura de la carne fresca (Hatae *et al.*, 1986) como cocinada (Sato *et al.*, 1986). En este sentido, la correlación genética positiva entre el porcentaje de colágeno y la longitud, estimada en el presente estudio, indican una posible mejora de éste a través del crecimiento, si bien no parece ser muy consistente debido a su alto error típico. Sin embargo, la alta y negativa correlación entre el porcentaje colágeno y la compacidad sí es más consistente sugiriendo que la mejora del crecimiento no cambiaría el porcentaje del colágeno, a menos que ocurran cambios en la conformación. Lo que parece ser un aspecto positivo, debido a que aunque pueda parecer contradictorio porque sugiere que no podemos mejorar la textura del pez, la correlación genética del colágeno con la humedad es positiva, y la humedad está alta e inversamente correlacionada con la grasa muscular.

En el caso del porcentaje de grasa visceral, Neira *et al.* (2004), en salmón coho, estimaron diferentes correlaciones genéticas (positiva o negativa) con respecto al peso, según la clase año, mientras que en trucha arcoiris Gjerde y Schaeffer (1989) describieron un valor bajo y positivo. Esto coincide con los datos del presente estudio, donde la correlación genética entre la grasa visceral y el peso fue baja y positiva, si bien no consistente debido a sus errores típicos,

mientras que con la longitud fue baja y negativa. Esto está concordancia con los resultados de la compacidad, ya que sus correlaciones genéticas y fenotípicas con la grasa visceral fueron positivas. Grigorakis y Alexis (2005), también en dorada, describieron una correlación fenotípica positiva entre el porcentaje de grasa visceral y la compacidad. En cuanto a las correlaciones genéticas de la grasa visceral con el rendimiento canal, éstas son muy consistentes entre especies. Así, tanto en salmónidos (Rye y Gjerde, 1996; Kause *et al.*, 2002; Neira *et al.* 2004), en lubina (Haffray *et al.*, 2007), como en el presente estudio los valores encontrados son altos y negativos (desde -0,44 hasta -0,98). Esto, junto a la alta heredabilidad del porcentaje de grasa visceral en dorada, sugiere que la inclusión de dicho carácter dentro de un programa de selección, permitiría contrarrestar el efecto negativo que tiene para el consumidor la grasa concentrada en la cavidad visceral (Grigorakis, 2007), a la vez que mejoraría el rendimiento canal. Ello cobra especial importancia cuando la industria tiene vías de comercialización a través del pescado fileteado, que en el caso de dorada está tomando cada vez más importancia (Luna, 2006), ya que al eviscerar el pez, pesar la grasa visceral solo supondría un paso más en el proceso. Similar conclusión ha sido establecida para el salmón del Atlántico (Rye y Gjerde, 1996). Por otro lado, mejorar el crecimiento en dorada, utilizando la longitud como criterio de selección, no produciría a priori cambios en la conformación del pez, tal y como se explicó anteriormente. Es más, atendiendo a las correlaciones genéticas del porcentaje de grasa visceral estimadas en el presente estudio, un aumento en la compacidad, a través de una selección del peso, podría acarrear como consecuencia un aumento del porcentaje de grasa visceral y una disminución en el rendimiento canal. Sin embargo, a través de la longitud, no se perjudicaría el rendimiento cárnico. En este orden de ideas, las correlaciones genéticas de la composición de la carne sugieren que la

mejora del crecimiento a través de la longitud tampoco perjudicaría el porcentaje de colágeno pero en cambio teniendo en cuenta la correlación entre ésta y la humedad, sí favorecería indirectamente el porcentaje de grasa muscular, mejorando la calidad de la carne.

#### **4.4.4. Interacción genotipo x ambiente (GxA)**

En especies de amplia distribución geográfica como la dorada o la lubina, puede ser importante estimar la interacción genotipo ambiente, cuando las empresas deseen exportar su producción a diferentes destinos o condiciones de engorde, para lo cual puede incluso ser recomendable establecer programas de selección específicos o líneas de selección para cada una de los ambientes (Dupont-Nivet *et al.*, 2008). Sin embargo, es de esperar que cuando todos los descendientes provienen de un mismo lote de reproductores y han sido criados en condiciones ambientales similares, las interacciones sean mínimas, tal y como ya se ha descrito en otras especies. Para caracteres de crecimiento, en trucha arcoiris, Fishback *et al.* (2002) estimaron altas correlaciones genéticas entre pesos y longitudes de peces criados en diferentes temperaturas, mientras que Palti *et al.* (2006) encontraron similar orden de las familias alimentadas con diferentes dietas. Ponzoni *et al.* (2005), en tilapia del Nilo, obtuvieron similar repuesta para el peso tanto en jaulas como en tanques. Dupont-Nivet *et al.* (2008) no encontraron interacción GxA en lubina entre los pesos de los peces criados en tres granjas con similares sistemas de engorde. Hanke *et al.* (1989), en salmón del Atlántico obtuvieron el mismo orden de familias criadas bajo dos sistemas diferentes de fotoperiodo. Todo esto está en concordancia con la ausencia de interacción GxA para los caracteres de crecimiento y de la canal estimada en este



estudio, puesto que mediante el método I no se encontró efecto significativo de esta interacción y mediante el método II, las correlaciones genéticas fueron muy altas.

En relación a los caracteres de composición de la carne, se han estudiado interacciones GxA entre dietas en distintas especies. Así, para el porcentaje de grasa y proteína muscular, Tobin *et al.* (2006) obtuvieron similar orden de familias en trucha arcoiris, al igual que Quinton *et al.* (2007) en Lavareto (*Coregonus lavaretus* L.) que estimaron correlaciones genéticas altas entre las dietas para los dos caracteres, aunque más bajas y con errores típicos más altos que las estimadas para las variables de crecimiento. En el presente estudio, las correlaciones genéticas entre estaciones para las variables de composición, también fueron menores que las de los caracteres de crecimiento y sus errores típicos mayores, quizás debido a que son las variables con heredabilidad muy baja, quedando diluido el factor familia. Es más, mediante el método I, no se encontró efecto significativo de la interacción, corroborando la ausencia de interacción GxA, también en estos caracteres.



## 5. CONCLUSIONES

---



## 5. CONCLUSIONES

---

1) En dorada, a partir de los 3 gramos de peso, es posible aplicar el sistema de marcaje físico *Passive Integrated Transponder* (PIT), en la cavidad abdominal, sin que afecte significativamente a la mortalidad ni al crecimiento de los peces.

2) En dorada, a partir de los 4 gramos de peso, el marcaje con el sistema PIT muestra una tasa de retención máxima, independientemente de la experiencia de la persona que marca.

3) El protocolo manual de marcaje físico puesto a punto en el presente estudio, para alevines de dorada, posibilita una tasa elevada de marcaje por persona y hora y el reconocimiento individual de los peces desde edades muy tempranas en el desarrollo, factores ambos de gran importancia para desarrollar esquemas de selección genética a escala industrial.

4) Las PCR múltiplex de microsatélites, RimA y RimB, desarrolladas en el presente estudio, muestran una exitosa amplificación cruzada entre distintas especies de espáridos.

5) El elevado número de marcadores microsatélites de las múltiplex RimA y RimB demuestra una eficacia del 100% en la reconstrucción de la genealogía de descendientes provenientes de puestas masales industriales, incluso en presencia de alelos nulos.

6) Los costes totales del genotipado de los diez marcadores microsatélites de la RimA, 6,3 veces más económicos que mediante reacciones simples, proporcionan a las empresas de dorada una herramienta factible para la incorporación de criterios genéticos en la gestión de reproductores y la producción de peces.

7) Los caracteres de crecimiento en dorada, a las edades económicamente más importantes (alevín, preengorde, maduración sexual incipiente y talla ración), presentan determinación genética aditiva media.

8) En dorada de talla comercial, los caracteres de la canal muestran heredabilidades bajas y medias, mientras que los caracteres de composición de la carne presentan una muy escasa determinación genética. Contrariamente, la grasa visceral muestra una componente genética aditiva alta.

9) Para mejorar el crecimiento en dorada, la longitud es un criterio adecuado debido a que es más fácil de medir y más repetible que el peso, a la vez que ambos caracteres presentan similares heredabilidades y altas correlaciones genéticas en todas las edades.

10) La selección directa de la longitud en dorada, mejoraría indirectamente el peso de la canal, el peso del filete y los caracteres de composición de la carne, sin tener que sacrificar los peces, y sin efecto sobre la morfología. Sin embargo, la correlación genética negativa entre la longitud y el rendimiento filete sugiere la inclusión de éste en los índices de selección.

11) La consideración de la grasa visceral como criterio en un esquema de selección en dorada permitiría disminuir la grasa visceral a la vez que aumentar el rendimiento cárnico.

12) En Canarias, no existe interacción genotipo ambiente (tanques y jaulas), para los caracteres de crecimiento, la canal y de calidad, en dorada.

13) Este estudio pone de relieve el potencial que tienen las empresas de dorada para optimizar su producción a través de la explotación de la variación genética aditiva, y no sólo desde el manejo y demuestra que conjugando los sistemas de marcaje físicos y genéticos es posible estimar parámetros genéticos bajo condiciones industriales, sin interferir en el sistema de producción.





## 6. BIBLIOGRAFÍA

---



## 6. BIBLIOGRAFÍA

---

- Acolas M.L., Roussel J.M., Lebel J.M., Baglinière J.L., 2007. Laboratory experiment on survival, growth and tag retention following PIT injection into the body cavity of juvenile brown trout (*Salmo trutta*). Fish. Res. 86, 280-284.
- Adcock, G.J., Bernal Ramírez, J.H., Hauser, L., Smith, P., Carvalho, G.R., 2000. Screening of DNA polymorphisms in samples of archived scales from New Zealand snapper. J. Fish Biol. 56, 1283-1287.
- Afonso, J.M., Roo, F.J., 2007. Anomalías morfológicas en peces cultivados: heredabilidad y selección. In Martínez, P., Figueras, A. (Eds.), Genética y genómica en acuicultura. C.S.I.C., Madrid, pp. 213-240.
- Alarcón, J.A., Magoulas, A., Georgakopoulos, T., Zouros, E., Alvarez, M.C., 2004. Genetic comparison of wild and cultivated European populations of the gilthead sea bream (*Sparus aurata*). Aquaculture 230, 65-80.
- APROMAR, 2008. La acuicultura marina de peces en España.
- Arias, A., 1980. Crecimiento, régimen alimentario y reproducción de la dorada (*Sparus aurata*) y de la lubina (*Dicentrarchus labrax*) en los esteros de Cádiz. Invest. Pesq. 44, 59-83.
- Astorga, N., Afonso, J.M., Zamorano M.J, Montero, D., Oliva, V., Fernández-Palacios, H., Izquierdo, M.S., 2005. Evaluation of visible implant elastomer tags for tagging juvenile gilthead seabream (*Sparus auratus* L.); effects on growth, mortality, handling time and tag loss. Aquacult. Res. 36, 733-738.
- Austin, B., Austin, D.A., 1999. Bacterial fish pathogens: disease of farmed and wild fish 3<sup>rd</sup> rev. ed. London Springer, 457 pp.
- Baras, E., Malbrouck, C., Houbart, M., Kestemont, P., Melard, C., 2000. The effect of PIT tags on growth and physiology of age-0 cultured Eurasian perch *Perca fluviatilis* of variable size. Aquaculture 185, 159-173.

- Baras, E., Westerloppe, L., Melard, C., Philippart, J.C., Benech, V., 1999. Evaluation of Implantation Procedures for PIT-Tagging Juvenile Nile Tilapia. *North American Journal of Aquaculture* , 61, 246-251.
- Batargias, C., Dermitzakis, E., Magoulas, A., Zouros, E., 1999. Characterization of six polymorphic microsatellite markers in gilthead seabream, *Sparus aurata*. *Mol. Ecol.* 8, 897-898.
- Batargias, C., Kotoulas, G., Magoulas, A. Zouros, E., 1997. Retrospective parentage identification in a mass spawning of gilthead seabream, by means of microsatellite DNA. Preliminary results of genetic selection. *Proceedings of the fifth Panhellenic Congress of Oceanography and Fisheries*, 15-18 April 1997, Kavala, Greece, 203-207.
- Bateman, D.S., Gresswell, R.E., 2006. Survival and Growth of Age-0 Steelhead after Surgical Implantation of 23-mm *Passive Integrated Transponders*. *N. Am. J. Fish.* 26, 545-550.
- Ben-Tuvia, A., 1979. Studies of the population and fisheries of *Sparus aurata* in the Bardawil Lagoon, Eastern Mediterranean. *Invest. Pesq.* 43, 43-67.
- Berg, O., Berg, M., 1990. Effects of Carlin tagging on the mortality and growth of anadromous Arctic char, *Salvelinus alpinus* (L.) *Aquacult. Fish. Manage.* 21, 221-227.
- Bergman, P.K., Haw, F., Blankenship, H.L., Buckley, R.M., 1992. Perspectives on design, use, and misuse of fish tags. *Fisheries.* 17, 20-25.
- Bernatchez, L., Duchesne P., 2000. Individual-based genotype analysis in studies of parentage and population assignment: how many loci, how many alleles? *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 57, 1-12.
- Blanco, G., Borrell, Y.J., Bernardo, D., Vázquez, E., Asturiano, J.F., Sánchez, J.A., Sánchez, J.A., 2007. The use of microsatellites for optimizing broodstocks in a hatchery of gilthead seabream (*Sparus aurata* L.). *Aquaculture* 272, S1-S246.
- Blouin, M.S., Parsons, M., Lacaille, V., Lotz, S., 1996. Use of microsatellite loci to classify individuals by relatedness. *Mol. Ecol.* 5, 393-401.

- Bonin, A., Bellemain, E., Eidesen, P.B., Popanon, F., Brochmann, C., Taberlet, P., 2004. How to track and assess genotyping errors in population genetic studies. *Mol. Ecol.* 13, 3261-3273.
- Borrell, Y.J., Carleos, C.E., Asturiano, J.F., Bernardo, D., Vázquez, E., Corral, N., Sánchez, J.A., Blanco G., 2007. Use of microsatellites and a combinatorial optimization approach in the acquisition of gilthead seabream (*Sparus aurata* L.) broodstocks for hatcheries. *Aquaculture* 269, 200-210.
- Brown, R.C., Tsalavouta, M., Terzoglou, V., Magoulas, A., McAndrew, B.J., 2005a. Additional microsatellites for *Sparus aurata* and cross-species amplification within the Sparidae family. *Mol. Ecol.* 5, 605-607.
- Brown, R.C., Woolliams, J.A., McAndrew, B.J., 2005b. Factors influencing effective population size in commercial populations of gilthead seabream, *Sparus aurata*. *Aquaculture* 247, 219-225.
- Bruyndoncx, L., Knaepkens, G., Meeus, W., Bervoets, L., Eens, M., 2002. The evaluation of passive integrated transponder (PIT) tags and visible implant elastomer (VIE) marks as new marking techniques for the bullhead. *J. Fish Biol.* 60, 260-262.
- Callen, D.F., Thompson, A.D., Shen, Y., Phillips, H.A., Richards, R.I., Mulley, J.C., 1993. Incidence and origin of null alleles in the (AC)<sub>n</sub> microsatellite markers. *Am. J. Hum. Genet.* 52, 922-927.
- Cardellino, R., Rovira, J., 1987. Mejoramiento genético animal. Hemisferio Sur, Buenos Aires, 253 pp.
- Castelló, F., 1993. Biología de los teleósteos más interesantes en piscicultura marina. En: Castelló, F. (Ed.), *Acuicultura marina: Fundamentos biológicos y tecnología de la producción*. Universidad de Barcelona, España, pp 61-67.
- Castro J., Pino, A., Hermida, M., Bouza, C., Chavarrías, D., Merino, P., Sánchez, L., Martínez P., 2007. A microsatellite marker tool for parentage assessment in gilthead seabream (*Sparus aurata*). En: M., Vandeputte, Chatain B., Hulata G. (Eds.), *Genetics in Aquaculture: Proceedings of the Ninth International Symposium*, 26-30 June 2006, Montpellier, France. *Aquaculture*, 272, Supplement 1, 210-216.

- Castro, J., Bouza, C., Presa, P., Pino-Querido, A., Riaza, A., Ferrerio, I., Sanchez, L., Martínez, L.M., 2004. Potential sources of error in parentage assessment of turbot (*Scophthalmus maximus*) using microsatellite loci. *Aquaculture* 242, 119-135.
- Castro, J., Pino-Querido, A., Hermida, M., Chavarrías, D., Romero, R., García-Cortés, L.A., Toro, M.A., Martínez, P., 2008. Heritability of skeleton abnormalities (lordosis, lack of operculum) in gilthead seabream (*Sparus aurata*) supported by microsatellite family data. *Aquaculture* 279, 18-22.
- Cejas, J., Villamandos, J., Samper, M., 1992. Estudio sobre la reproducción de la dorada (*Sparus aurata*) en Canarias: Influencia del peso/edad de las hembras sobre la calidad de la puesta. *Informes Técnicos Instituto Español de Oceanografía* 126, 1-38.
- Chistiakov, D.A., Hellemans, B., Volckaert F.A.M., 2006. Microsatellites and their genomic distribution, evolution, function and applications: A review with special reference to fish genetics. *Aquaculture* 255, 1-29.
- Dare, M.R., 2003. Mortality and Long-term Retention of Passive Integrated Transponder Tags by Spring Chinook Salmon. *N. Am. J. Fish. Manage.* 23, 1015-1019.
- Day, J.J., 2002. Phylogenetic relationships of the Sparidae (Teleostei: Percoidei) and implications for convergent trophic evolution. *Biol. J. Linnean Soc.* 76, 269-301.
- Deniz, M.S., Real, F., Acosta, B., Acosta, F., Oros, J., 1993. *Vibrio harveyi* as an opportunistic pathogen on gilthead seabream (*Sparus aurata*). *Centro de Investigaciones Marinas*, 593-598.
- Dermitzakis, E.T., Clark, A.G., Batargias, C., Magoulas, A., Zouros, E., 1998. Negative covariance suggests mutation bias in a two-locus microsatellite system in fish *Sparus aurata*. *Genetics* 150, 1567-1575.
- Dodds, K.G., Tate, M.L., Sise, J.A., 2005. Genetic evaluation using parentage information from genetic markers. *J. Anim. Sci.* 83, 2271-2279.

- Doupé, R.G, Lymbery, A.J., 2005. Genetic covariation in production traits of sub-adult black bream *Acanthopagrus butcheri* after grow-out. *Aquacult. Res.* 36, 1128-1132.
- Doyle, R.W., Perez-Enríquez, R., Takagi, M., Taniguchi, N., 2001. Selective recovery of founder genetic diversity in aquacultural broodstocks and captive, endangered fish populations. *Genetica* 111, 191-304.
- Dupont-Nivet, M., Vandeputte, M., Vergnet, A., Merdy, O., Haffray, P., Chavanne, H., Chatain, B., 2008. Heritabilities and GxE interactions for growth in the european sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) using a marker-based pedigree. *Aquaculture* 275, 81-87.
- El-Ibiary, H.M., Joyce, J.A., 1978. Heritability of body size traits, dressing weight and lipid content in channel catfish. *J.Anim.Sci.*, 47, 82-88 .
- Elvingson, P., Johansson, K., 1993. Genetic and environmental components of variation in body traits of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) in relation to age. *Aquaculture* 118, 191-204.
- Elvingson, P., Nilsson, J., 1994. Phenotypic and genetic parameters of body and compositional traits in Arctic charr, *Salvelinus alpinus* (L.). *Aquacult. Fish. Manage.* 25, 677-685.
- Feldhaus, J.W., Heppell, S.A., Mesa, M.G., Li, H., 2008. Hepatic heat shock protein 70 and plasma Cortisol levels in rainbow trout after tagging with a *Passive Integrated Transponder*. *Trans. Am. Fish. Soc.* 137, 690-695.
- Fernández, J., Toro, M. A., 2006. A new method to estimate relatedness from molecular markers. *Mol. Ecol.* 15, 1657-1667.
- Fishback, A.G., Danzmann, R.G., Ferguson, M.M., Gibson, J.P., 2002. Estimates of genetic parameters and genotype by environment interactions for growth traits of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) as inferred using molecular pedigrees. *Aquaculture* 206, 137-150.
- Flos, R., Reig, L., Oca, J., Ginovart, M., 2002. Influence of marketing and different land-based system on gilthead sea bream (*Sparus aurata*) quality. *Aquac. Int.* 10, 189-206.

- Franch, R., Louro, B., Tsalavouta, M., Chatziplis, D., Tsigenopoulos, C.S., Sarropoulou, E., Antonello, J., Magoulas, A., Mylonas, C.C., Babbucci, M., Patarnello, T., Power, D.M., Kotoulas, G., Bargelloni, L., 2006. A genetic linkage map of the hermaphrodite teleost fish *Sparus aurata* L. *Genetics* 174, 851-861.
- Frey, J.E., Frey, B., Sauer, C., Kellerhals, M., 2004. Efficient low-cost DNA extraction and multiplex fluorescent PCR method for marker-assisted selection in breeding. *Plant Breeding* 123, 554-557.
- Friars, G.W., Bailey J.K., O'Flynn F.M., 1995. Applications of selection for multiple traits in cage-reared Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Aquaculture* 137, 213-217.
- Ginés, R., 1997. Posibilidades de manipulación del fotoperíodo durante el engorde intensivo de dorada (*Sparus aurata*). Tesis doctoral, Universidad de Las Palmas de Gran Canaria.
- Ginés, R., Afonso, J.M., Argüello, A., Zamorano, M.J., López, J.L., 2003. Growth in adult gilthead seabream (*Sparus aurata* L.) as a result of interference in sexual maturation by different photoperiod regimes. *Aquacult. Res.*, 34, 73-83.
- Ginés, R., Afonso, J.M., Argüello, A., Zamorano, M.J., López, J.L., 2004. The effects of long-day photoperiod on growth, body composition and skin colour in immature gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.). *Aquacult. Res.* 35, 1207-1212.
- Gjedrem, T., 1997. Flesh quality improvement in fish through breeding. *Aquac. Int.* 5, 197-206.
- Gjedrem, T., Olesen, I., 2005. Basic statistical parameters. En: Gjedrem (Ed.), *Selection and breeding programs in aquaculture*. Springer, Berlín, pp. 45-72.
- Gjedrem, T., Thodesen, J., 2005. Selection. En: Gjedrem (Ed.), *Selection and breeding programs in aquaculture*. Springer, Berlín, pp. 89-111.



- Gjerde, B., Gjedrem, T., 1984. Estimates of phenotypic and genetic parameters for carcass traits in Atlantic salmon and rainbow trout. *Aquaculture* 36, 97-110.
- Gjerde, B., Schaeffer, L.R., 1989. Body traits in rainbow trout II. estimates of heritabilities and of phenotypic and genetic correlations. *Aquaculture* 80, 25-44.
- Gorshkov, S., Gordin, H., Gorshkova, G., Knibb, W., 2002. Genetic improvement of sea bass and seabream: practical applications. *Isr. J. Aquacult.-Bamidgeh* 54, 53.
- Gries, G., Letcher, B.H., 2002. Tag retention and survival of age-0 Atlantic salmon following surgical implantation with passive integrated transponder tags. *N. Am. J. Fish. Manage.* 22, 219-222
- Grigorakis, K., 2007. Compositional and organoleptic quality of farmed and wild gilthead sea bream (*Sparus aurata*) and sea bass (*Dicentrarchus labrax*) and factors affecting it: A review. *Aquaculture* 272, 55-75.
- Grigorakis, K., Alexis, M.N., 2005. Effects of fasting on the meat quality and fat deposition of commercial-size farmed gilthead sea bream (*Sparus aurata*, L.) fed different dietary regimes. *Aquacult. Nutr.* 11, 341-344.
- Grigorakis, K., Alexis, M.N., Taylor, K.D.A., Hole, M., 2002. Comparison of wild and cultured gilthead sea bream: composition, appearance and seasonal alterations. *Int. J. Food Sci. Technol.* 37, 477-484.
- Haffray, P., Pincet, C., Dupont-Nivet, M., Vandeputte, M., Merdy, O., Chavanne, H., Chatain, B., 2007. Heritabilities and GxE interactions for quality traits in the European sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.). En: Vandeputte, M., Chatain, B., Hulata, G. (Eds.), *Genetics in Aquaculture: Proceedings of the Ninth International Symposium, 26-30 June 2006, Montpellier, France*. *Aquaculture*, vol. 272, pp. 265. Supplement 1.
- Hanel, R., Sturmbauer, C., 2000. Multiple recurrent evolution of trophic types in northeastern Atlantic and Mediterranean seabreams (Sparidae, Percoidei). *J. Mol. Evol.* 50, 276-283.

- Hanke, A.R., Friars, G.W., Terhune, J.M., 1989. Family x photoperiod interaction on growth in juvenile Atlantic salmon, *Salmo salar*. *Genome* 32, 1105-1112.
- Hatae, K., Tobimatsu, A., Takeyama, M., Matsumoto, J.J., 1986. Contribution of the connective tissues on the texture difference of various fish species. *Nippon Suisan Gakkaishi* 52, 2001-2007.
- Henegariu, O., Heerema, N.A., Dlouhy, S.R., Vance, G.H., Vogt, P.H., 1997. Multiplex PCR: Critical parameters and step-by-step protocol. *BioTechniques* 23, 504-511.
- Herbinger, C.M., O'Reilly, P.T., Doyle, R.W., Wright, J.M., O'Flynn, F., 1999. Early growth performance of Atlantic salmon full-sib families reared in single family tanks versus in mixed family tanks. *Aquaculture* 173, 105-116.
- Herran, R., Rejon, C.R., Rejon, M.R., Garrido-Ramos, M.A., 2001. The molecular phylogeny of the Sparidae (Pisces, Perciformes) based on two satellite DNA families. *Heredity* 87, 691-697.
- Ingram, B., 1994. Tagged fish and microchips. *Aust. Fish.* 53, 29-32.
- Iwamoto, R.N., Myers, J.M., Hershberger, W.K., 1990. Heritability and genetic correlations for flesh coloration in pen-reared coho salmon. *Aquaculture* 86, 181-190.
- Izquierdo, M.S., Obach, A., Arantzamendi, L., Montero, D., Robaina, L., Rosenlund, G., 2003. Dietary lipid sources for seabream and seabass: growth performance, tissue composition and flesh quality. *Aquacult. Nutr.* 9, 397-407.
- Izquierdo, M.S., Montero, D., Robaina, L., Caballero, M.J., Rosenlund, G., Ginés, R., 2005. Alterations in fillet fatty acid profile and flesh quality in gilthead seabream (*Sparus aurata*) fed vegetable oils for a long term period. Recovery of fatty acid profiles by fish oil feeding. *Aquaculture* 250, 431-444.
- Jamieson, A., Taylor S.C.S., 1997. Comparisons of three probability formulae for parentage exclusion. *Anim. Genet.* 28, 397-400.

- Jean, C.T., Lee, S.C., Liu C.W., Tseng M.C., 2006. Isolation and characterization of eight microsatellite loci from Picnic seabream (*Acanthopagrus berda*). Mol. Ecol. Notes 6, 1269-1271.
- Jeong, D.S., González E.B., Morishima K., Arai K., Umino T., 2007. Parentage assignment of stocked black sea bream *Acanthopagrus schlegelii* in Hiroshima Bay using microsatellite DNA markers. Fish. Sci. 73, 823-830.
- Jones, A.G., Ardren, W.R., 2003. Methods of parentage analysis in natural populations. Mol. Ecol. 12, 2511-2523.
- Jover, M., 2007. Alternativas de futuro para la producción de la dorada (*Sparus aurata*). En: A., Cerviño-Eiroa, Guerra-Díaz A., Pérez-Acosta C. (Eds.), Cultivando el futuro: Libro de actas del XI Congreso Nacional de Acuicultura, 24-28 September 2007, Vigo, Spain, 1337-1342.
- Kalinowski, S.T., Taper, M.L., Marshall, T.C., 2007. Revising how the computer program CERVUS accommodates genotyping error increases success in paternity assignment. Mol. Ecol. 16, 1099-1106.
- Kause, A., Paananen, T., Ritola, O., Koskinen, H., 2007. Direct and indirect selection of visceral lipid weight, fillet weight, and fillet percentage in a rainbow trout breeding program. J. Anim. Sci. 85, 3218-3227.
- Kause, A., Ritola, O., Paananen, T., 2002. Coupling body weight and its composition: a quantitative genetic analysis in rainbow trout. Aquaculture 211, 65-79.
- King, T.L., Kalinowski, S.T., Schill, W.B., Spidle, A.P., Lubinski, B.A., 2001. Population structure of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.): a range-wide perspective from microsatellite DNA variation. Mol. Ecol. 10, 807-821.
- Knibb, W., Gorshkova, G., Gorshkov, S., 1997. Selection for growth in the gilthead seabream, *Sparus aurata* L. Isr. J. Aquacult.-Bamidgeh 49, 57-66.
- Knibb, W., Gorshkova, G., Gorshkov, S., 1998. Selection and crossbreeding in Mediterranean cultured marine fish (Review). Cahiers Options Méditerranéennes 34, 47-60.

- Kocour, M., Mauger, S., Rodina, M., Gela, D., Linhart, O., Flajshans, M., Vandeputte, M., 2007. Heritability estimates for growth and dress out traits in common carp (*Cyprinus carpio* L.) using a molecular pedigree. *Aquaculture* 270, 43-50.
- Kolstad, K., Thorland, I., Refstie, T., Gjerde, B., 2006. Genetic variation and genotype by location interaction in body weight, spinal deformity and sexual maturity in atlantic cod (*Gadus morhua*) reared at different locations off Norway. *Aquaculture* 259, 66-73.
- Kovač M., Groeneveld E., García-Cortés L.A., 2002. VCE-5: A package for the optimization of dispersion parameters. Proceedings of the 7<sup>th</sup> World Congress on Genetics Applied to Livestock Production, 20-23 August 2002, Montpellier, France.
- Landolt, L., 1989. NMFS PIT- Tag experiment. Apendex A.
- Launey, S., Krieg F., Haffray, P., Bruant, J.S., Vanniers, A., Guyomard, R., 2003. Twelve new microsatellite markers for gilthead seabream (*Sparus aurata* L.): characterization, polymorphism and linkage. *Mol. Ecol.* 3, 457-459.
- Liu, Z.J., Cordes J.F., 2004. DNA marker technologies and their applications in aquaculture genetics. *Aquaculture* 238, 1-37.
- López-Fanjul C., Toro, M.A., 2007. Fundamentos de la mejora genética en acuicultura. En: Martínez, P., Figueras, A. (Eds.), *Genética y genómica en acuicultura*. Madrid, pp. 155-182.
- Luna, L., 2006. La demanda de filete de dorada en el mercado español en el mercado de la dorada y la lubina en la Unión Europea en el periodo 2003-2006. Informe de la Secretaría General de Pesca Marítima del Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación del Gobierno de España.
- Mahapatra, K.D., Gjerde, B., Reddy, P.V.G., Sahoo, M., Jana, R.K., Saha, J.N., Rye, M., 2001. Tagging: on the use of passive integrated transponder (PIT) tags for the identification of fish. *Aquacult. Res.* 32, 47-50.
- Markoulatos, P., Siafakas, N., Moncany M., 2002. Multiplex polymerase chain reaction: a practical approach. *J. Clin. Lab. Anal.* 16, 47-51.

- Marshall, T.C., Slate, J., Kruuk, L.E.B., Pemberton J.M., 1998. Statistical confidence for likelihood-based paternity inference in natural populations. *Mol. Ecol.* 7, 639-655.
- Micale, V., Perdichizzi, F., 1990. Gonadal responsiveness to photoperiod extension in captivity-born *Sparus aurata* (L.) during the male phase. *Boll. Zool.* 57, 21-26.
- Moffett, I.J.J., Crozier, W.W., Kennedy, J.A., 1997. A comparison of five external marks for Atlantic salmon. *Salmo salar* L. *Fish. Manage. Ecol.* 4, 49-53.
- Montero, D., Robaina, L., Tort, L., Afonso, J.M., Fernández-Palacios, H.E., Izquierdo, M.S., 2001. Selective breeding for stress tolerance in gilthead seabream *Sparus aurata*. Proceedings of the World Aquaculture 2001. 21-25 January 2001, Orlando, USA.
- Moretti, A., Pedini, M.F.C., Citolin, G., Guidastrì, R., 1999. Manual on hatchery production of Seabass and Gilthead seabream. Vol 1. Food and Agriculture Organization of the United Nations Roma.
- Myers, J.M., Hershberger, W.K., Saxton, A.M., Iwamoto, R.N., 2001. Estimates of genetic and phenotypic parameters for length and weight of marine net-pen reared coho salmon (*Oncorhynchus kisutch* Walbaum). *Aquacult. Res.* 32, 277-285.
- Navarro, A., Badilla, R., Zamorano, M.J., Pasamontes, V., Hildebrandt, S., Sánchez, J.J., Afonso, J.M., 2008. Development of two new microsatellite multiplex PCRs for three sparid species: Gilthead seabream (*Sparus auratus* L.), red porgy (*Pagrus pagrus* L.) and redbanded seabream (*P. auriga*, Valenciennes, 1843) and their application to paternity studies. *Aquaculture* 285, 30-37.
- Navarro, A., Oliva, V., Astorga, N., Zamorano, M.J., Roo, J., Hernández-Cruz, C., Ginés, R., Afonso, J.M., 2004. Competitive growth of juvenile gilthead seabream (*Sparus auratus* L.), from intensive hatchery and mesocosmos technology, reared under intensive conditions with self-feeder. En: Adams, S., Olafsen, J.A. (Eds.), *Biotechnologies for quality: Proceedings of the Aquaculture Europe' 04, 20-23 October 2004, Barcelona, Spain.* European Aquaculture Society Special Publications N° 34, 607-608.

- Navarro, A., Oliva, V., Zamorano, M.J., Ginés, R., Izquierdo, M.S., Astorga, N., Afonso, J.M., 2006. Evaluation of PIT system as method to tag fingerlings of gilthead seabream (*Sparus auratus* L.): effects on growth, mortality and tag loss. *Aquaculture* 257, 309-315.
- Neff, B.D., Fu, P., Gross, M.R., 2000. Microsatellite multiplexing in fish. *Trans. Amer. Fish. Soc.* 129, 584-593.
- Neira, R., Lhorente, J.P., Araneda, C., Díaz, N., Bustos, E., Alert, A., 2004. Studies on carcass quality traits in two populations of Coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*) phenotypic and genetic parameters. *Aquaculture* 241, 117-131.
- Norris, A., Bradley, D., Cunningham, E., 2000. Parentage and relatedness determination in farmed Atlantic salmon (*S. salar*) using microsatellite markers. *Aquaculture* 182, 73-83.
- Oliva, V., 2008. Análisis de variabilidad genética mediante marcadores microsatélites y de la expresión del gen Delta 6 desaturasa, en poblaciones de dorada (*Sparus aurata*). Tesis doctoral, Universidad de Las Palmas de Gran Canaria.
- Oliva, V., Zamorano, M.J., Astorga, N., Ginés, R., Navarro, A., Cavari, B., Funkenstein, B., Afonso, J.M., 2005. Microsatellite diversity in natural populations of *Sparus aurata* using interspecific and intraspecific markers. En: Neira, R., Diaz, N. (Eds.), *Genetics in Aquaculture VIII. Proceedings of the Eighth International Symposium, 9-15 November 2003, Puerto Varas, Chile.* *Aquaculture* 247, 27.
- Palka, K., 1999. Changes in intramuscular connective tissue and collagen solubility of bovine *m. semitendinosus* during retorting. *Meat Science* 53, 189-194.
- Palti, Y., Silverstein, J.T., Wieman, H., Philips, J.G., Barrows, F.T., Parsons, J.E., 2006. Evaluation of family growth response to fishmeal and gluten-based diets in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture* 255, 548-556.

- Paterson, S., Piertney S.B., Knox, D., Gilbey J., Verspoor, E., 2004. Characterization and PCR multiplexing of novel highly variable tetranucleotide Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) microsatellites. *Mol. Ecol. Notes* 4, 160-162.
- Piñera, J.A., Bernardo, D., Blanco, G., Vázquez, E., Sánchez, J.A., 2006. Isolation and characterization of polymorphic microsatellite markers in *Pagellus bogaraveo*, and cross-species amplification in *Sparus aurata* and *Dicentrarchus labrax*. *Mol. Ecol. Notes* 6, 33-35.
- Ponce, M., Infante, C., Crespo, A., Zuasti, E., Pérez, L., Funes, V., Catanese, G., Cárdenas, S., Manchado, M., 2006. Characterization of microsatellite loci for the redbanded reabream, *Pagrus auriga* (Teleostei, Sparidae). *Mol. Ecol. Notes* 6, 527-529.
- Ponzoni, R., Hamzah, A., Tan, S., Kamaruzzaman, N., 2005. Genetic parameters and response to selection for live weight in the GIFT strain of Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Aquaculture* 247, 203-210.
- Powell, J., White, I., Guy, D., Brotherstone, S., 2008. Genetic parameters of production traits in Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Aquaculture* 274, 225-231.
- Prentice, E.L., Waknitz, F., Maynard, D.J., Sparks-McConkey, P., McCutcheon, C.S., Steffens, W., Jensen, A.L., Stuehrenberg, L.C., Downing, S.L., Sanford, B., Newcomb, T.W., Neff, D., 1989. Study to Determine the Biological Feasibility of a New Fish Tagging System. Project No. 1983-31900, 193 electronic pages, (BPA Report DOE/BP-11982-4).
- Presá, P., Guyomard, R., 1996. Conservation of microsatellites in three species of salmonids. *J. Fish Biol.* 49, 1326-1329.
- Quartararo, N., Bell, J.D., 1992. Effect of intraperitoneal passive implantable transponder (PI) tags on the growth and survival of juvenile snapper, *Pagrus auratus* (Bloch and Schneider). *Aquacult. Fish. Manage.* 23, 543-548.
- Ramšák, A., Garoia, F., Guarniero, I., Mannini, P., Tinti, F., 2003) Novel polymorphic microsatellite markers for the common Pandora (*Pagellus erythrinus*). *Mol. Ecol. Notes* 3, 553-555.

- Real, F.A., Oros, J., Acosta, F., Acosta, B., Santana, P., Deniz, S., 1997. Pasteurellosis of gilthead seabream (*Sparus aurata*) in Gran Canaria Island, Spain. Bull. Eur. Assoc. Fish Pathol. 17, 153-157.
- Renshaw, M.A., Saillant, E., Bradfield, S.C., Gold, J.R., 2006. Microsatellite multiplex panels for genetic studies of three species of marine fishes: red drum (*Sciaenops ocellatus*), red snapper (*Lutjanus campechanus*), and cobia (*Rachycentron canadum*). Aquaculture 253, 731-735.
- Robaina, L., Moyano, F.J., Izquierdo, M.S., Socorro, J., Vergara, J.M., Montero, D., 1997. Corn gluten and meat and bone meals as protein sources in diets for gilthead seabream (*Sparus aurata*): Nutritional and histological implications. Aquaculture 157, 347-359.
- Rogers, S.M., Marchand, M.H., Bernatchez, L., 2004. Isolation, characterization and cross-salmonid amplification of 31 microsatellite loci in the lake whitefish (*Coregonus clupeaformis*, Mitchill). Mol. Ecol. Notes 4, 89-92.
- Roo, F.J., Socorro, J., Izquierdo, M.S., Caballero, M.J., Hernandez-Cruz, C.M., Fernandez, A., Fernandez-Palacios, H., 1999. Development of red porgy *Pagrus pagrus* visual system in relation with changes in the digestive tract and larval feeding habits. Aquaculture 179, 499-511
- Roques, S., Galarza J.A., MacPerson E., Turner, G.F., Rico, C., 2006. Isolation and characterization of nine polymorphic microsatellite markers in the two-banded sea bream (*Diplodus vulgaris*) and cross-species amplification in the white sea bream (*Diplodus sargus*) and the saddled bream (*Oblada melanura*). Mol. Ecol. Notes 7, 661-663
- Roussel, J.M., Haro, A., Cunjak, R.A., 2000. Field test of a new method for tracking small fishes in shallow rivers using passive integrated transponder (PIT) technology. Can. J. Fish. Aquat. Sci. 57, 1326-1329.
- Rutten, M.J.M., Bovenhuisb, H., Komena, H., 2005. Genetic parameters for fillet traits and body measurements in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus* L.). Aquaculture 246, 125-132.
- Rye, M., Gjerde, B., 1996. Phenotypic and genetic parameters of body composition traits and flesh colour in Atlantic salmon, *Salmo salar* L. Aquacult. Res. 27, 121-133.

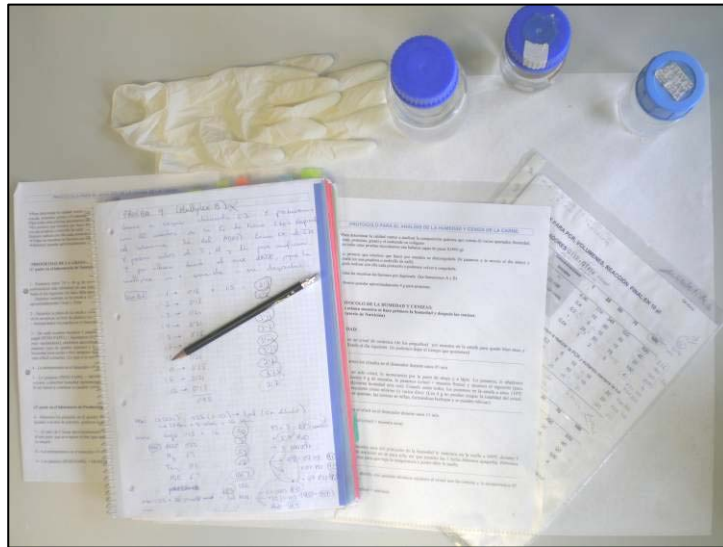


- Saillant, E., Dupont-Nivet, M., Haffray, P., Chatain, B., 2006. Estimates of heritability and genotype-environment interactions for body weight in sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) raised under communal rearing conditions. *Aquaculture* 254, 139-147.
- Saillant, E., Ma, L., Wang, X., Gatlin, D.M., Gold, J.R., 2007. Heritability of juvenile growth traits in red drum (*Sciaenops ocellatus* L.). *Aquacult. Res.* 38, 781-788.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T., 1989. *Molecular Cloning. A laboratory manual*. 2<sup>nd</sup> edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, N.Y.
- Sánchez, J.J., Borsting, C., Hallenberg, C., Buchard, A., Hernández, A., Morling, N., 2003. Multiplex PCR and minisequencing of SNPs—a model with 35 Y chromosome SNPs. *Forensic Sci. Int.* 137, 74-84.
- Santinha, P.J.M., Medale, F., Corraze, G., Gomez, E.F.S., 1999. Effects of the dietary protein: lipid ratio on growth and nutrient utilization in gilthead seabream (*Sparus aurata* L.). *Aquac. Nutr.* 5, 147-156.
- Sato, K., Yoshinaka, R., Sato, M., Ikeda, S., 1986. A simplified method for determining collagen in fish muscle. *Nippon Suisan Gakkaishi* 52, 889-893.
- Selkoe, K.A., Toonen, R.J., 2006. Microsatellites for ecologists: a practical guide to using and evaluating microsatellite markers. *Ecol. Letters* 9, 615-629.
- Senger, E., Priat, C., Hitte, C., Sarropoulou, E., Franch, R., Geisler, R., Bargelloni, L., Power, D., Galibert, F., 2006. The first radiation hybrid map of a perch-like fish: The gilthead seabream (*Sparus aurata* L.). *Genomics* 87, 793-800.
- Soula, M., Navarro, A., Zamorano, M.J., Roo, J., Hernández-Cruz, C.M., Afonso, J.M., 2009. Evaluation of physical tags (VIE and PIT) to identify fingerling of red porgy (*Pagrus pagrus*). *ICES J. Mar. Sci.* En revisión.
- Stockley, B.M., Rogers, A.D., Iyengar, A., Menezes, G., Santos, R., Long, A., 2000. Ten microsatellite loci isolated and developed for the blackspot seabream, *Pagellus bogaraveo* (Brunnich 1768). *Mol. Ecol.* 9, 999-1000.

- Suárez, M.D., Abad, M., Ruiz-Cara, T., Estrada, J.D., García-Gallego, M., 2005. Changes in muscle collagen content during post mortem storage of farmed sea bream (*Sparus aurata*): Influence on textural properties. *Aquac. Int.* 13, 315-325.
- Summers, K., Amos, W., 1996. Behavioral, ecological, and molecular genetic analyses of reproductive strategies in the Amazonian dart-poison frog, *Dendrobates ventrimaculatus*. *Behav. Ecol.* 8, 260-267.
- Takagi, M., Taniguchi, N., Cook, D., Doyle, R.W., 1997. Isolation and characterization of microsatellite loci from red sea bream *Pagrus major* and detection in closely related species. *Fish. Sci.* 63, 199-204.
- Tobin, D., Kause, A., Mantysaari, E.A., Martin, S.A.M., Houlihan, D.F., Dobby, A., Kiessling, A., Rungruangsak-Torrissen, K., Ritola, O., Ruohonen, K., 2006. Fat or lean? The quantitative genetic basis for selection strategies of muscle and body composition traits in breeding schemes of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture* 261, 510-521.
- Vandeputte, M., Kocour, M., Mauger, S., Dupont-Nivet, M., De Guerry, D., Rodina, M., Gela, D., Vallod, D., Chevassus, B., Linhart, O., 2004. Heritability estimates for growth-related traits using microsatellite parentage assignment in juvenile common carp (*Cyprinus carpio* L.). *Aquaculture* 235, 223-236.
- Vandeputte, M., Kocour, M., Mauger, S., Rodina, M., Launay, A., Gela, D., Dupont-Nivet, M., Hulak, M., Linhart, O., 2008. Genetic variation for growth at one and two summers of age in the common carp (*Cyprinus carpio* L.): Heritability estimates and response to selection. *Aquaculture* 277, 7-13.
- Vieira, V., Norris, A., Johnston, I.A., 2007. Heritability of fibre number and size parameters and their genetic relationship to flesh quality traits in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). En: M., Vandeputte, Chatain B., Hulata G. (Eds.), *Genetics 397 in Aquaculture: Proceedings of the Ninth International Symposium, 26-30 June 2006, Montpellier, France.* *Aquaculture*, 272, Supplement 1, 100-109.

- Villanueva, B., Verspoor, E., Visscher P.M., 2002. Parental assignment in fish using microsatellite genetic markers with finite numbers of parents and offspring. *Anim. Genet.* 33, 33-41.
- Weatherley, A.H., Gill H.S., 1983. Protein, lipid, water and caloric contents of immature rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson, growing at different rates. *J. Fish Biol.* 23, 653-673.
- Wesmajervi, M.S., Westgaard, J.I., Delghandi, M., 2006. Evaluation of a novel pentaplex microsatellite marker system for paternity studies in Atlantic cod (*Gadus morhua* L.). *Aquacult. Res.* 37, 1195-1201.
- Winkelman, A.M., Peterson, R.G., 1994. Genetic parameters (heritabilities, dominance ratios and genetic correlations) for body weight and length of chinook salmon after 9 and 22 months of saltwater rearing. *Aquaculture* 125, 31-36.
- Yang, W.T., Li, J., Yue, G.H., 2006. Multiplex genotyping of novel microsatellites from silver pomfret (*Pampus argenteus*) and cross-amplification in other pomfret species. *Mol. Ecol. Notes.* 6, 1073-1075.
- Zamil, M., Rawdah, T., Attar, K., Arab, M., 1992. Mineral and proximate composition of some commercially important fish of the Arabian Gulf. *Food Chem.* 45, 95-8.
- Zhang, Q., Reigh R.C., Wolters, W.R., 1994. Growth and body composition of pond-raised hybrid striped basses, *Morone saxatilis* x *M. chrysops* and *M. saxatilis* x *M. mississippiensis*, fed low and moderate levels of dietary lipid. *Aquaculture* 125, 119-129.
- Zohar, Y., Abraham, M., Gordin, Y.H., 1978. The gonadal cycle of the captivity-reared hermaphroditic teleost *Sparus aurata* (L.) during the first two years of life. *Ann. Biol. anim. Bioch. Biophys.* 18, 877-882.





## ANEXO I PROTOCOLOS

---



## ANEXO I - PROTOCOLOS

---

### **1. Extracción de ADN a partir de aleta**

- a) Tomar una muestra de aproximadamente 50 mg de aleta, introducirla en un tubo de 1,5 ml y cortarla en pequeños trozos con una tijera limpia.
- b) Añadir 400 µl de tampón de lisis:
- |              |           |
|--------------|-----------|
| Tris pH: 8,0 | 50 mM     |
| EDTA pH: 8,0 | 100 mM    |
| NaCl         | 100 mM    |
| SDS          | 1 %       |
| Proteinasa-K | 100 µg/ml |
- c) Incubar a 50° C y en agitación suave durante 10 a 24 horas.
- d) Añadir un volumen de fenol equilibrado con Tris 0,1 M (pH: 8,0), el cual arrastrará todo lo orgánico.
- e) Agitar suavemente las muestras durante 15 minutos.
- f) Centrifugar durante 15 minutos a 8.000 g a temperatura ambiente.
- g) Recuperar la fase superior, sin coger la fase fenólica y transferirla a un tubo limpio. (Repetir los pasos d, e y f, en caso de no obtener la fase superior traslúcida).

- h) Añadir a la fase fenólica 350  $\mu$ l de TE 1X y volver al paso e. Para recuperar el ADN que queda en la interfase.
- i) Agregar un volumen de cloroformo-isoamílico (24:1) (aproximadamente 650  $\mu$ l).
- j) Agitar suavemente durante 15 minutos.
- k) Centrifugar durante 15 minutos a 8.000 g a temperatura ambiente.
- l) Recuperar la fase superior y transferirla a un tubo limpio.
- m) Agregar 1 volumen (aproximadamente 500  $\mu$ l) de isopropanol frío y mezclar suave y ligeramente las fases a fin de observar un “ovillo” de ADN o puntos blancos finos, aunque si no se ve no quiere decir que no obtengamos ADN al final. Luego, dejar precipitar 24 horas a 4°C.
- n) Centrifugar 30 minutos a 12.000 g a 4°C. (A más tiempo más rendimiento, pero el ADN estará más apelmazado y puede haber problemas en la PCR). También se puede centrifugar durante 10 minutos y obtener ADN de alto peso molecular, transpasar el sobrenadante a otro tubo, volver a centrifugar y obtener el de bajo peso.
- o) Con una pipeta pasteur alargada a la llama, eliminar el sobrenadante con cuidado de no arrastrar el pellet, para ello colocar la punta en el lado del tubo que daba al interior del eje en la centrifugación.
- p) Añadir 400  $\mu$ l de etanol al 70 % para lavar el pellet, retirando el exceso de sal.
- q) Centrifugar 10 minutos a 12.000 g a 4°C.



- r) Eliminar el etanol 70 % con la pipeta Pasteur, lo más que se pueda, ya que si quedan sales perjudicarán la PCR. Evaporar el remanente a 37° C en la estufa o en la secadora de vacío durante 15 minutos a 30°C.
  
- s) Resuspender en 50 µl de TE 1X y mantener las muestras a 4° C. Una vez evaluado y cuantificado, diluir una alícuota en agua Milli-Q, ya que el TE afecta a la estabilidad del fluorocromo del cebador que se usa en la PCR.

## **2. Determinación de la cantidad de humedad del filete**

- a) Descongelar el filete y trituirarlo. De cada filete se analizan dos muestras.
- b) Poner un crisol de cerámica por muestra en la estufa a 110°C durante unas horas para quede bien seco.
- c) Atemperar el crisol en el desecador durante unos 45 min.
- d) Sacar el crisol y numerarlo por la parte de abajo a lápiz. Pesarlo (peso crisol), añadir aproximadamente 4 g de muestra y lo volver a pesarlo (peso crisol + muestra fresca). (Los 4 g no pueden ocupar la totalidad del crisol, pues cuando se queman, las cenizas se inflan, formándose burbujas y se pueden rebosar).
- e) Lo secamos en la estufa a 110°C durante 24 horas.
- f) Atemperamos el crisol en el desecador durante unos 15 min.
- g) Pesar el crisol (peso crisol + muestra seca).
- h) Determinar la cantidad de humedad por resta:  $(\text{peso crisol} + \text{muestra fresca}) - (\text{peso crisol} + \text{muestra seca}) = (\text{peso humedad})$ . Para expresarlo como porcentaje hace falta el peso de la muestra:  $(\text{peso crisol} + \text{muestra fresca}) - (\text{peso crisol})$ .
- i) Este mismo crisol (peso crisol + muestra seca) se utilizará en el protocolo de determinación de la cantidad de cenizas.

### **3. Determinación de la cantidad de cenizas del filete**

- a) Calentar el el crisol con la muestra seca utilizado en el análisis de la humedad en la mufla a 600°C durante 5 horas. Esperar unas 12 horas para que baje la temperatura para abrir la mufla.
- b) Sacar con guantes térmicos el crisol con las cenizas.
- c) Atemperarlo 45 min en el desecador.
- d) Pesar el crisol (peso crisol + cenizas).
- e) Determinar la cantidad de cenizas por resta:  $(\text{peso crisol} + \text{cenizas}) - (\text{peso crisol}) = (\text{peso cenizas})$ . Para expresarlo como porcentaje hace falta el peso de la muestra:  $(\text{peso crisol} + \text{muestra fresca}) - (\text{peso crisol})$ .

#### **4. Determinación de la cantidad de grasa del filete**

- a) Añadir entre 20 y 40 g del filete picado en una placa de petri de cristal.
- b) Calentar en la estufa a 105°C, durante 24 horas, la placa de petri (sin tapar) y 2 trozos de papel watman de aproximadamente 14 x 10 cm.
- c) Sacar la placa de la estufa y volver a triturar la muestra seca (en un molinillo de café).
- d) Atemperar los papeles watman en el desecador durante 15 minutos, numerarlos con un lápiz y pesar cada uno (peso papel).
- e) De cada muestra (placa de petri) se obtendrán 2 paquetes. Añadir aproximadamente 2g de muestra a cada papel, hacer un paquete sin que queden ranuras.
- f) Calentar los paquetes en la estufa a 105°C durante 24 horas.
- g) Atemperar los paquetes en el desecador 30 min aproximadamente.
- h) Pesar cada paquete (peso papel + muestra seca) y mantener en el desecador hasta analizarlo en el Soxhlet, porque el éter se disuelve parcialmente en agua, que a su vez extraerá azúcares entre otros compuestos, lo que puede ser fuente de error.
- i) Colocar 2 paquetes en cada cámara extractora del Soxhlet y mantener el proceso de extracción mediante lavados con éter de petróleo durante aproximadamente 3 horas.

- j) Finalizado el proceso sacar los paquetes y dejarlos unos minutos al aire para que se evapore el éter (que es altamente inflamable).
- k) Calentar los paquetes en la estufa a 105° durante 24 horas.
- l) Atemperar los paquetes en el desecador 30 min aproximadamente.
- m) Pesar cada paquete (peso papel + muestra seca sin grasa).
- n) Determinar la cantidad de grasa por resta:  $(\text{peso papel} + \text{muestra seca}) - (\text{peso papel} + \text{muestra seca sin grasa}) = (\text{peso grasa})$ . Para calcular el peso de la muestra seca:  $(\text{peso papel} + \text{muestra seca}) - (\text{peso papel})$ . Y para expresarlo como porcentaje de la muestra fresca le añadimos al peso seco el porcentaje de humedad.

### **5. Determinación de la cantidad de hidroxiprolina del filete**

- a) Añadir aproximadamente 2 g de muestra en un tubo de ensayo de vidrio (Pesar el tubo, tarar, añadir la muestra y apuntar el peso).
- b) Añadir 15 ml de ácido sulfúrico (solución 3 M) y dejar el tubo sin tapar en la estufa a 105°C durante 24 horas.
- c) Filtrar el contenido del tubo pasándolo por un fonil de vidrio con un filtro de papel watman, a un matraz de 100 ml.
- d) Añadir al tubo vacío 10 ml de la solución ácido sulfúrico 3M y volver a filtrar.
- e) Enrasar con agua destilada y mezclar.
- f) Transferir 4 ml de la solución filtrada a un tubo de plástico y lo tapamos.
- g) Preparar la solución madre de hidroxiprolina (500 µg/ml): Añadir 50 mg de hidroxiprolina a un matraz de 100ml, añadir una gota de solución de ácido sulfúrico 3M y enrasar con agua destilada. Esta solución es estable 1 mes a 4°C.
- h) Preparar los tubos estándares que constituirán la curva patrón, a partir de la solución madre de hidroxiprolina, con las siguientes concentraciones: 0 (blanco); 0,1; 0,2; 0,3; 0,5; 1; 1,5 y 2 µg/ml, y transferir 4 ml de cada una a un tubo de plástico.
- i) Preparar la solución tampón: Disolver 26 g de ácido cítrico monohidratado, 14 g de hidróxido de sodio y 78 g de sodio acetato monohidratado en 500

ml de agua destilada. Transferir a un matraz de un litro, añadir 250 ml de 1-propanol y enrasar con agua destilada. Debe estar a pH: 6,8 y es estable durante varias semanas a 4°C.

- j) Preparar la solución reagente cloramina T (inmediatamente antes de usar): disolver 1,41 g de p-Toluensulfonilcloramida Sódica (cloramina T), en 100 ml de la solución tampón (0,0141g clorT/ml tampón).
- k) Añadir a cada tubo de muestra y de estándar, 2 ml de la solución reagente cloramina T. Mezclar y dejarlos a temperatura ambiente durante 20 min.
- l) Preparar la solución reagente de color (en el día de su uso): Disolver 10 g de p-dimetilaminobenzaldehído (Ehrlich's reagent) en 35 ml de una solución de ácido perclórico al 60% y luego muy despacio añadir 65 ml de 2-propanol.
- m) Añadir a cada tubo de muestra y de estándar, 2 ml de la solución reagente de color, mezclar rápidamente y mantener los tubos a un baño de agua de 60°C durante 20 min.
- n) Enfriar los tubos con agua fría y lo dejarlos durante 30 min a temperatura ambiente.
- o) Leer una alícuota de cada tubo en el espectrofotómetro a 558 nm. Comparando las absorbancias con las de la curva patrón se obtienen las concentraciones de hidroxiprolina de cada tubo ( $\mu\text{g/ml}$ ). Las cuales se multiplican x100 y se dividen por el peso de la muestra puesta en el tubo de ensayo, para obtener los  $\mu\text{g}$  de hidroxiprolina por g de muestra.









*1. Navarro et al., 2006*

---

# Evaluation of PIT system as a method to tag fingerlings of gilthead seabream (*Sparus auratus* L.): Effects on growth, mortality and tag loss

A. Navarro, V. Oliva, M.J. Zamorano, R. Ginés, M.S. Izquierdo,  
N. Astorga, J.M. Afonso \*

Grupo de Investigación en Acuicultura, Instituto Universitario de Sanidad Animal y Seguridad Alimentaria,  
Universidad de Las Palmas de Gran Canaria, Trasmontaña s/n, 35416, Arucas, Spain

Received 7 September 2005; received in revised form 25 January 2006; accepted 28 February 2006

## Abstract

This study examines the utility of Passive Integrated Transponder (PIT) tagging system in fingerlings of gilthead seabream, *Sparus auratus* L. Two different body positions (abdominal, dorsal) and four weight classes (2–3 g, 3–4 g, 4–5 g, 5–8 g) were tested in three experiments. Tag loss rate, as well as its effect on growth and mortality rates, was determined. Times of handling and healing were also assessed. Fish tagged in the abdominal cavity showed a significantly lower tag loss rate (14%) than those given dorsal muscle implants (40%). No differences were found in growth within experiment between tagged and untagged fish, their final mean weight ranging between 6–39 g and 6–38 g, respectively. There was no difference in mortality between tagged and untagged fish at any position (0–3.4% and 0–2.1%, respectively). Fish smaller than 3 g suffered significantly higher mortality (14.3%), indicating that the PIT tags are not suitable for very small individuals. PIT retention rate was 100% above 4 g, irrespective of the personal expertise in tagging. Mean tag application time was 19 s per fish. Mean wound healing time was close to 20 days. Hence, these results showed that PIT tagging of gilthead seabream above 3 g is feasible because it does not affect growth or mortality.  
© 2006 Elsevier B.V. All rights reserved.

**Keywords:** Identification; Gilthead seabream; *Sparus auratus* L.; Passive integrated transponder; Tagging system; PIT tag

## 1. Introduction

The gilthead seabream (*Sparus auratus*) is an important species in Mediterranean aquaculture as showed by total production of 100,300 tons (FEAP, 2004). Nowadays, breeding programs are being

developed on both local (Afonso et al., 1998; Montero et al., 2001; Gorshkov et al., 2002) and industrial scales. Identification of individual fish under selection schemes is very important because the knowledge of family structure is essential in the estimation of genetic parameters and breeding values. Moreover, precise estimates for the former require offspring to be kept together in order to avoid additional common environment sources (Herbinger et al., 1999). For this reason, fish recognition under these conditions has to be achieved using unequivocal tags.

\* Corresponding author. División de Acuicultura Instituto Universitario de Sanidad Animal y Seguridad Alimentaria, C/. Trasmontaña s/n, 35416, Arucas, Las Palmas, Spain. Tel.: +34 928 451112; fax: +34 928 451142.

E-mail address: [jafonso@dapat.ulpgc.es](mailto:jafonso@dapat.ulpgc.es) (J.M. Afonso).

Fish may be tagged with internal or external systems. External systems have the advantages of being economical, easy to apply and do not require sophisticated equipment (Moffett et al., 1997). However, they carry the potential disadvantages of affecting growth, health and survival (Berg and Berg, 1990; Bergman et al., 1992; Moffett et al., 1997). On the contrary, internal systems, such as the Passive Integrated Transponders (PIT), appear to have little or no effect on fish growth and survival (Prentice et al., 1989; Quartararo and Bell, 1992; Baras et al., 1999, 2000; Gries and Letcher, 2002).

Tagging systems need to be tested for each species because of differences in susceptibility to anaesthesia and manipulation, capacity for recovery, growth rate and morphology. Thus, several studies have been carried out on salmonids such as sockeye salmon, *Oncorhynchus nerka* (Prentice et al., 1989), Atlantic salmon, *Salmo salar* (Gries and Letcher, 2002) and chinook salmon, *Oncorhynchus tshawytscha* (Dare, 2003), perches such as Eurasian perch, *Perca fluviatilis* (Baras et al., 2000) and Golden perch, *Macquaria ambigua* (Ingram, 1994), Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (Baras et al., 1999), rohu carp, *Labeo rohita* (Mahapatra et al., 2001), bullhead, *Cottus gobio* (Bruyndoncx et al., 2002) and in juveniles of red snapper *Pagrus auratus* (Quartararo and Bell, 1992). Until present there are no reports concerning tagging of gilthead seabream, despite its importance in breeding programs. Thus, this study was conducted to examine the utility of Passive Integrated Transponder (PIT) tagging system in fingerlings of gilthead seabream. Tag loss rate, as well as its effect on growth and mortality rates was determined in different fish sizes and two different body locations. Times of handling and healing were also assessed.

## 2. Materials and methods

Three consecutive experiments were carried out to determine: (a) a suitable tag body location (Experiment

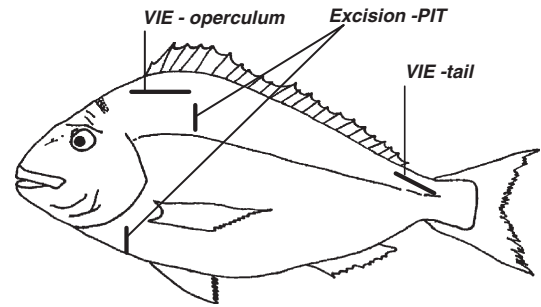


Fig. 2. Tag positions on the fingerling gilthead seabream. *Excision-PIT*, locations used to tag fish with PIT (PIT-A, abdominal cavity; PIT-M vertebral back muscle). *VIE-operculum*, location to tag control fish with VIE system. *VIE-tail*, location to tag PIT tagged fish with VIE system (PIT-A, left side; PIT-M, right side).

1) and (b) the lower fish size (Experiments 2 and 3), considering in both cases tag loss rate and tagging effects on mortality and growth. All experiments were carried out at the Canary Institute of Marine Sciences (Gran Canaria, Canary Islands, Spain).

### 2.1. Tagging protocol

All fish were anaesthetised with chlorobutanol (200 mg/L) prior to tagging with Passive Integrated Transponders (PIT; Trovan Ltd., UK). PIT tagging was carried out with tags of  $0.096 \pm 0.0007$  g weight and  $2.05 \times 11$  mm size, previously immersed in alcohol and introduced horizontally into the fish using a syringe. Iodine was applied after the injection. Two locations were used to tag fish: (i) the abdominal cavity between the pelvic fins and the lower maxilla (PIT-A; Fig. 1A) and (ii) the vertebral back muscle (PIT-M; Fig. 1B). Previously to PIT injection, a 2.7 mm excision was applied (Fig. 2). PIT codes were detected by ARE H5 reader (Trovan Ltd., UK).

Due to PIT tagged and untagged fish were cultured in the same tanks, both fish classes were also tagged with Visible Implant Elastomer (VIE; Northwest Marine

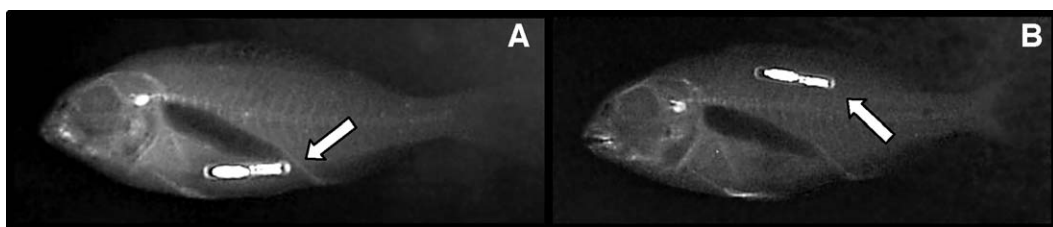


Fig. 1. X-rays of gilthead seabream fingerlings tagged with PITs. (A) Abdominal cavity PIT (PIT-A), below the swim bladder. (B) Vertebral back muscle PIT (PIT-M).

Technology, Shaw Island Washington, WA, USA), in order to correct mortality and tag loss rates in all experiments. Thus, PIT-A and PIT-M fish were also tagged with red colour of VIE system in left and right sides of the tail, respectively, while control fish were tagged with red colour in left side next to operculum (Fig. 2). VIE tagging was carried out following the supplier's and Astorga et al. (2005) recommendations, who showed that the most visible colour/orientation in gilthead seabream was red/horizontal. These authors found that the VIE tagging system had no effect on seabream survival or growth and the tag retention rate was 100%.

## 2.2. Experiment 1

The objective of this experiment was to determine a suitable body location for PIT tags. PIT-A and PIT-M fish were used as tagged fish and an untagged fish group as control (C). The effects on growth and mortality by comparison with the control group (C), and PIT loss rate were evaluated.

A total of 103 fish with an average initial weight (mean±S.E.) of  $3.45\pm 0.03$  g were used. Of these, 36 fish were assigned to PIT-A, and 33 to PIT-M. The remaining 34 were untagged fish. All fish were randomly assigned to one of two 500 L tanks, with equal proportions of the three groups in each tank. Fish were kept in those tanks for 26 days and fed with fish pellets according to the manufacturer's instructions (Proaqua S. A., Dueñas, Palencia, Spain). Average initial density was  $0.36\pm 0.01$  kg/m<sup>3</sup> and water flow, temperature, and dissolved oxygen content along the experiment were 4 L/min,  $19.84\pm 0.07$  °C and  $6.42\pm 0.08$  mg/L, respectively. Weight and length were measured at three sampling periods: days 0, 15 and 26. Mortality and PIT loss rates were recorded at the end of the experiment (day 26).

## 2.3. Experiment 2

The main objective of this experiment was to determine the best fish size for tagging in a weight range of 2 to 8 g, in terms of tag loss rate and tagging effect on fish growth and mortality.

A total of 908 fish with an average weight of  $4.63\pm 0.04$  g were used. Of these, 668 were subject to PIT-A tags, while the remaining fish were untagged (C). Both classes were randomly assigned to one of two 1000 L tanks for 66 days and fed as in Experiment 1. Average initial density was  $2.26\pm 0.08$  kg/m<sup>3</sup> and water flow, temperature, and dissolved oxygen content

were 21 L/min,  $22.46\pm 0.06$  °C and  $6.21\pm 0.08$  mg/L, respectively. Fish weight and length were measured on days 0, 36 and 66.

## 2.4. Experiment 3

This experiment was carried out to evaluate, mainly, the effect of the marker's experience on fish mortality and tag loss rates by comparison with other previous experiments.

PIT-A tagging was applied to 102 individuals (mean weight  $6.26\pm 0.12$  g). A further 180 individuals (mean weight  $6.23\pm 0.09$  g) were assigned to the untagged group (C). Fish were distributed across three 1000 L tanks and maintained as in previous experiments for a period of 58 days. Average initial density was  $0.59\pm 0.01$  kg/m<sup>3</sup> and water flow, temperature, and dissolved oxygen content were 22 L/min,  $20.97\pm 0.12$  °C and  $6.61\pm 0.11$  mg/L, respectively. Fish weight and length were measured on days 0, 30 and 58.

## 2.5. Pathogen assays

Fish that died were analysed for infectious organisms (*Vibrio* spp. and *Photobacterium* spp.) previously described in Canary Islands (Deniz et al., 1993; Real et al., 1997) in several organs (kidney, liver, spleen) and excision wound, following the methods of Austin and Austin (1999).

## 2.6. Data analysis

Specific growth rates were estimated as follows:

$$\text{SGR (\%)} = (\ln\text{FW} - \ln\text{IW})100/\Delta T$$

FW, IW and  $\Delta T$  were final weight, initial weight and time interval respectively.

Weight data were analysed using a General Linear Model (GLM), with tank and tag as fixed factors, using SPSS v13.0 (SPSS, Chicago, IL, USA). PIT weight was not considered on weight comparison because there was not any significant effect. All data were tested for normality and homogeneity of variances. The GLM was such that:

$$Y_{ijk} = \mu + \alpha_i + \beta_j + (\alpha\beta)_{ij} + \varepsilon_{ijk}$$

$\mu$  is the population mean,  $\alpha_i$  is the fixed effect of the tank,  $\beta_j$  is the fixed tag effect,  $(\alpha\beta)_{ij}$  is the interaction between the factors, and  $\varepsilon_{ijk}$  is the residual error.

Table 1

Experiment 1: initial, intermediate and final weights, PIT loss and mortality rates

| Tag               | <i>N</i> | Initial mean weight (g) | Mean weight, day 15 (g) | Final mean weight (g) | Tag loss rate (%) | Mortality (%) |
|-------------------|----------|-------------------------|-------------------------|-----------------------|-------------------|---------------|
| Abdominal (PIT-A) | 36       | 3.45±0.04               | 4.66±0.12 <sup>a</sup>  | 6.02±0.20             | 14 <sup>a</sup>   | 2.8           |
| Muscle (PIT-M)    | 33       | 3.46±0.06               | 4.98±0.14 <sup>b</sup>  | 6.46±0.26             | 40 <sup>b</sup>   | 0             |
| Untagged (C)      | 34       | 3.44±0.05               | 5.25±0.15 <sup>b</sup>  | 6.11±0.16             | –                 | 0             |

Values in each column not sharing the same letter are significantly different ( $P < 0.05$ ). Values are given as means±S.E.

The mortality data for tagged and untagged fish, and tag loss rate for tagged fish, were analysed using a log linear model as follows:

$$\ln f_{ij} = \mu + \alpha_i + \beta_j + \alpha\beta_{ij}$$

$f_{ij}$  is the expected frequency of the cell  $ij$ ,  $\mu$  is the mean of the logarithms of expected frequencies,  $\alpha_i$  is the effect of the  $i$ th category of the mortality or loss factor,  $\beta_j$  is the effect of the  $j$ th category of the weight range or tagging system category,  $\alpha\beta_{ij}$  is the interaction between these factors.

### 3. Results

#### 3.1. Growth, mortality and tag loss within experiments

##### 3.1.1. Experiment 1

Results are summarized in Table 1. No effect was found on either body position on growth rates of smaller fish. Mean weights of tagged (3.45±0.03 g) and control fish (3.44±0.05 g) were very similar at the beginning of the experiment ( $P > 0.90$ ), with all fish weighing between 3 and 4 g. At the end of the experiment, the PIT-M fish were slightly heavier than the rest (6.46±0.26 g versus 6.04±0.12 g), although the difference was not significant ( $P > 0.30$ ). At the intermediate measurement sampling (15 days) the tagged fish were lighter than untagged fish (4.80±0.09 g and 5.25±0.15 g, respectively), although this was only significant for PIT-A (4.66±0.12 g) ( $P < 0.05$ ). Results of tests on fish length at the beginning and end of the experiment mirrored those for body weight.

There was a significant difference in PIT loss rate between tagging positions, being highest for PIT-M ( $P < 0.05$ ) (Table 1). Mortality rates were very low, being even zero for PIT-M and control fish.

##### 3.1.2. Experiment 2

The results are summarized in Table 2. At the beginning of the experiment, there were significant differences between PIT-A (4.78±0.04 g) and untagged fish (4.47±0.07 g) ( $P < 0.05$ ). Similar differences were observed at the end of the experiment for PIT-A (39.39±0.31 g) and untagged (37.65±0.50 g) ( $P < 0.05$ ). Specific daily growth rates were also the same in tagged and untagged fish (3.2%). This was also observed at the intermediate measurement sampling (36 days) (20.45±0.17 g and 19.30±0.28 g for PIT-A and untagged fish, respectively) ( $P < 0.05$ ).

PIT loss rate was low (Table 2) and associated to fish weight. Fish with weights from 2 to 3 g (Table 3) show a much higher tag loss rate than any of the other weight classes ( $Z_{2-3 \text{ g, TAG LOSS}} = +3.0$ ,  $P < 0.05$ ).

Concerning to mortality, rates between tagged and untagged fish were similar ( $P > 0.60$ ) (Table 2). However, within tagged fish, there were significant differences among range sizes. Thus, fish with weights from 2 to 3 g showed a significant excess of dead fish versus size classes ( $Z_{2-3 \text{ g, DEAD}} = +3.32$ ,  $P < 0.05$ ) (Table 3).

##### 3.1.3. Experiment 3

Results are summarized in Table 4. In this experiment mean weights were similar between tagged and untagged fish at the beginning of the experiment (6.26±0.12 g and 6.23±0.09 g, respectively) as well

Table 2

Experiment 2: initial, intermediate and final weights, PIT loss and mortality rates

| Tag               | <i>N</i> | Initial mean weight (g) | Mean weight, day 30 (g) | Final mean weight (g)   | SGR (%) | Tag loss rate (%) | Mortality (%) |
|-------------------|----------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|---------|-------------------|---------------|
| Abdominal (PIT-A) | 668      | 4.78±0.04 <sup>a</sup>  | 20.45±0.17 <sup>a</sup> | 39.39±0.31 <sup>a</sup> | 3.2     | 1.7               | 3.4           |
| Untagged (C)      | 240      | 4.47±0.07 <sup>b</sup>  | 19.30±0.28 <sup>b</sup> | 37.65±0.50 <sup>b</sup> | 3.2     | –                 | 2.1           |
| Total             | 908      | 4.63±0.04               | 19.87±0.16              | 38.52±0.29              | 3.2     | –                 | 3.1           |

Values in each column not sharing the same letter are significantly different ( $P < 0.05$ ). Values are given as means±S.E.

Table 3  
Experiment 2: PIT loss and mortality rates across weight classes for PIT tagged fish only

| Weight class | N   | Tag loss rate (%) | Mortality (%)     |
|--------------|-----|-------------------|-------------------|
| 2–3 g        | 35  | 8.6 <sup>a</sup>  | 14.3 <sup>a</sup> |
| 3–4 g        | 145 | 2.8 <sup>b</sup>  | 3.4 <sup>b</sup>  |
| 4–5 g        | 239 | 0.8 <sup>b</sup>  | 2.5 <sup>b</sup>  |
| 5–8 g        | 249 | 0.8 <sup>b</sup>  | 2.8 <sup>b</sup>  |

Values in each column not sharing the same letter are significantly different ( $P < 0.05$ ).

as at the 30- and 58-day measurement sampling ( $12.48 \pm 0.23$  g and  $27.56 \pm 0.51$  g for PIT-A fish,  $12.54 \pm 0.18$  g and  $28.46 \pm 0.38$  g for untagged fish, respectively).

No PIT tags were lost by any fish during this experiment. Mortality was very low and confined to just 1.2% of untagged fish. Mortality was not detected in PIT tagged fish.

### 3.2. Mortality and tag loss among experiments

Fish that died were analysed for infectious organisms (*Vibrio* spp. and *Photobacterium* spp.). The results were negative and thus no relationship between mortality and infection was detected. Within the three experiments, accumulated mortality did not differ between tagged and untagged fish. Most of the mortality occurred during the first week due to handling, as shown by the 35% mortality in Experiment 2. Comparing across the three experiments for PIT-A fish shows no significant change in corrected mortality rate relative to untagged fish at sizes  $> 3$  g (2.8%, 1.3% and 0% for Experiments 1, 2 and 3, respectively). However, the PIT tags do have a negative effect on 2–3 g fish survival (Table 3).

Tag loss rates among experiments for PIT-A fish showed an inverse and statistically significant relationship with size of tagged fish, primarily due to the high tag loss rate in Experiment 1 ( $Z_{\text{EXPERIMENT 1, TAG LOSS}} = +3.42$ ;  $P < 0.05$ ) (Tables 1, 2, and 4). The person's experience on tagging the fish clearly influences tag loss rate, as shown by its decrease loss rates from Experiments 1 to 3, since the same person was tagging

the fish in the three experiments. For small sizes (3–4 g) the tag loss rate decreased 11.2% between Experiments 1 and 2 (again due to high tag loss rates in experiment 1:  $Z_{\text{EXPERIMENT 1, TAG LOSS}} = +4.3$ ,  $P < 0.05$ ). In contrast there were no statistically significant differences between Experiments 2 and 3 for 4–8 g fish.

### 3.3. Handling and healing times

Mean tagging time was 19 s per fish. This included the time to make the excision, the posterior application of iodine and fish return to the feeding tank.

The mean wound healing time was approximately 20 days. Some fish had completely healed after 15 days, and all fish had healed after 26 days.

## 4. Discussion

Concerning to PIT tag location in fish body, tag loss rate was 26% lower in fish tagged in the abdominal cavity than in the back muscle, for 3–4 g fish of 5–7 cm in length. However, there were no differences in growth and mortality between fish tagged in these two positions and neither between tagged and untagged fish. Ingram (1994) found no tag loss in 32–51 cm Golden perch that were tagged in either the opercular muscle or the abdominal cavity. This appears to be a size related effect given that we have also found zero tag loss in gilthead seabream and seabass of around 200 g and 21 cm long, which were tagged in the same positions (unpublished data). Despite the fact that there were no differences in weight at the end of the experiments, abdominal cavity tagged fish showed lower growth rates during the first 2 weeks after tagging, possibly due to some compression of the digestive system by the PIT. This was subsequently compensated by increased growth rates. Baras et al. (1999, 2000) have also observed decreased growth rates in abdominal cavity tagged fish relative to untagged fish, which were compensated.

PIT tagging is a rapid system that allows individual recognition of fish. The minimisation of the tagging time does however require that the person responsible for tagging is experienced and dexterous. It also depends

Table 4  
Experiment 3: initial, intermediate and final weights, PIT loss and mortality rates

| Tag               | N   | Initial mean weight (g) | Mean weight, day 30 (g) | Final mean weight (g) | Tag loss rate (%) | Mortality (%) |
|-------------------|-----|-------------------------|-------------------------|-----------------------|-------------------|---------------|
| Abdominal (PIT-A) | 102 | $6.26 \pm 0.12$         | $12.48 \pm 0.23$        | $27.5 \pm 0.51$       | 0                 | 0             |
| Untagged (C)      | 180 | $6.23 \pm 0.09$         | $12.54 \pm 0.18$        | $28.46 \pm 0.38$      | –                 | 1.2           |
| Total             | 282 | $6.24 \pm 0.07$         | $12.51 \pm 0.15$        | $28.01 \pm 0.32$      | –                 | 1.0           |

Values are given as means  $\pm$  S.E.



on fish size, tissue toughness, the application of a previous excision, and continuity of the tagging session. Baras et al. (1999) took 40 s per fish (90 fish per hour) when tagging anaesthetised Nile tilapia of between 3 and 7 g (with an excision applied prior to tagging). The same group took 60 s per fish (60 fish per hour) when tagging Eurasian perch of mean size 5.1 g that had been treated in the same manner (Baras et al., 2000). Gries and Letcher (2002) took 36–45 s (80–100 fish per hour) to tag 22.5 g Atlantic salmon, previously excised. In this study we were able to tag fish in 19 s between 2 and 8 g (189 fish per hour), possibly because we used a sharpened needle rather than a scalpel to carry out the excision. There may also be an additional species effect: in Nile tilapia it was necessary to carefully remove some scales after the excision, prior to insertion of the PIT (Baras et al., 1999).

The main mortality caused by PIT tagging system is frequently found during the first 10 days after tagging (Baras et al., 1999, 2000; Gries and Letcher, 2002; Dare, 2003). In this study, no significant differences were found in mortality between tagged and untagged fish, whereas the total mortality of our experiments was mainly found along the first week after tagging. In terms of mortalities of different weight classes, the results are in agreement with those of Baras et al. (1999) who, as in the second experiment (corrected for control values), found zero mortality for 4–7 g fish. However, the same authors obtained a much higher mortality (17%) in low fish size classes than found in Experiment 1 (2.8%). The cause of this difference could be related to the tagging protocol given that the aforementioned authors attributed some of the losses to organ damage that occurred during excisions close to the cloaca. Mahapatra et al. (2001) observed high mortalities of 20%, 12% and 10% for fish in weight classes 2–4 g, 4–6 g and 6–8 g, respectively (not corrected for control values). In the present study, the uncorrected mortalities in Experiment 2 for the same weight classes were much lower (5.5%, 2.5% and 3.3%, respectively), probably due to the fact those authors did not apply an excision prior to injection. Baras et al. (1999) showed a substantial difference in mortality rate between previously-excised and non-excised fish (70%).

In the present study, tag loss rates were associated with fish size, with heavier fish being less likely to lose the PIT. This is similar to the results obtained by Prentice et al. (1989) who obtained negligible tag loss rates (1% and 0% in 6.8 cm and 8.2 cm fish, respectively) in sockeye salmon. Dare (2003) found similar rates (1%) in 10–20 cm chinook salmon.

Reported values for 2–11 g Eurasian perch are 20% (Baras et al., 2000), and 0% for 32–51 cm Golden perch (Ingram, 1994). Surprisingly, higher tag loss rates have been reported in larger carp, i.e., 4% in fish >15 g, as opposed to no losses in 2–15 g fish (Mahapatra et al., 2001). No PITs were lost from similar sized (4–15 g) bullhead (Bruyndoncx et al., 2002). However, Baras et al. (1999) encountered tag loss rates of 10% and 14.3% for 2–4 g and 4–7 g weight classes of Nile tilapia, respectively, even though the excision wound healed very rapidly (10 days). The only member of the Sparidae family that has been studied to date is the red snapper (Quartararo and Bell, 1992). This authors found losses of 4–8% for fish with a mean weight of  $59 \pm 18$  g. Comparison of tag loss rates among the three experiments here, and among weight classes in Experiment 2, showed a statistically significant size effect, possibly because the gilthead seabream has a less fusiform morphology, similar to Nile tilapia (Baras et al., 1999), Eurasian perch (Baras et al., 2000) and Golden perch (Ingram, 1994), when compared with sockeye salmon (Prentice et al., 1989), chinook salmon (Dare, 2003) and rohu carp (Mahapatra et al., 2001), which have a greater longitudinal space in the peritoneal cavity.

It is worth reviewing wound-healing times, particularly as shorter times seem to be associated with excision prior to introducing the PIT (Baras et al., 1999, 2000). Times for complete wound healing of the excision or point at which the PIT is introduced is quite variable: reported values are 10 days for Nile tilapia (Baras et al., 1999), 18 days for Eurasian perch (Baras et al., 2000), 32 days for Atlantic salmon (Roussel et al., 2000), 47 days for sockeye salmon (Prentice et al., 1989) and, approximately, 20 days in this study. This variability is possibly caused by several factors like fish size and growth rate differences among the different species studied.

Considering all findings together, mortality and tag loss rates, the most convenient weight for PIT tagging gilthead seabream by untrained staff is 6.5 g (range 4–8 g). However, it is possible to reduce the minimum fish size to 3–4 g, if an experienced person carries out the tagging. More importantly, it is shown that there are no significant differences in mortality among PIT tagged > 3 g weights, so the PIT itself does not appear to have an important influence. Dare (2003) observed a strong association between the person carrying out the tagging and tag loss rate. On the other hand, sizes below 3 g are not recommended, because the mortality becomes significantly higher and does not appear to depend on the person's experience on tagging, as seen in Experiment 2.

## 5. Conclusions

The present study has shown that PIT tagging of gilthead seabream above 3 g is feasible without affecting growth or mortality. The PIT retention rate is maximal (100%) above 4 g, independent of the person's experience on tagging. Besides, this method has been proved to be very fast, allowing the tagging of 189 fish per hour and person, and denoting its convenience for both industrial and pilot research scales even for very young fish.

## Acknowledgments

The authors wish to thank Ada Martín, Manolo San Román and Moneiba Suárez from the aquaculture department of the Canary Institute of Marine Sciences for their help in rearing the fish, and the staff of Ictiopathology and Infectious Diseases department from University of Las Palmas de Gran Canaria. We also acknowledge the comments of anonymous referees. This study was financed by the Canary Islands Government Grant PI2002/212.

## References

- Afonso, J.M., Montero, D., Robaina, L., Fernández, H., Izquierdo, M. S., Ginés, R., 1998. Selection programmes for stress tolerance. *Cahiers Options Méditerranéennes* 34, 235–245.
- Astorga, N., Afonso, J.M., Zamorano, M.J., Montero, D., Oliva, V., Fernández-Palacios, H., Izquierdo, M.S., 2005. Evaluation of visible implant elastomer tags for tagging juvenile gilthead seabream (*Sparus auratus* L.); effects on growth, mortality, handling time and tag loss. *Aquaculture Research* 36, 733–738.
- Austin, B., Austin, D.A., 1999. *Bacterial Fish Pathogens: Disease of Farmed and Wild Fish*, 3rd. Springer, London. 457 pp.
- Baras, E., Westerloppe, L., Melard, C., Philippart, J.C., Benech, V., 1999. Evaluation of implantation procedures for PIT-Tagging juvenile Nile tilapia. *North American Journal of Aquaculture* 61, 246–251.
- Baras, E., Malbrouck, C., Houbart, M., Kestemont, P., Melard, C., 2000. The effect of PIT tags on growth and physiology of age-0 cultured Eurasian perch *Perca fluviatilis* of variable size. *Aquaculture* 185, 159–173.
- Berg, O., Berg, M., 1990. Effects of Carlin tagging on the mortality and growth of anadromous Arctic char, *Salvelinus alpinus* (L.). *Aquaculture and Fisheries Management* 21, 221–227.
- Bergman, P.K., Haw, F., Blankenship, H.L., Buckley, R.M., 1992. Perspectives on design, use, and misuse of fish tags. *Fisheries* 17 (4), 20–25.
- Bruyndoncx, L., Knaepkens, G., Meeus, W., Bervoets, L., Eens, M., 2002. The evaluation of passive integrated transponder (PIT) tags and visible implant elastomer (VIE) marks as new marking techniques for the bullhead. *Journal of Fish Biology* 60, 260–262.
- Dare, M.R., 2003. Mortality and Long-term Retention of Passive Integrated Transponder Tags by Spring Chinook Salmon. *North American Journal of Fisheries Management* 23, 1015–1019.
- Deniz, M.S., Real, F., Acosta, B., Acosta, F., Oros, J., 1993. *Vibrio harveyi* as an opportunistic pathogen on gilthead seabream (*Sparus aurata*). *Centro de Investigaciones Marinas*, 593–598.
- FEAP, 2004. The Federation of European Aquaculture Producers. <http://www.feap.info/feap/>.
- Gorshkov, S., Gordin, H., Gorshkova, G., Knibb, W., 2002. Genetic improvement of sea bass and seabream: practical applications. *Israeli Journal of Aquaculture-Bamidgeh* 54 (2), 53.
- Gries, G., Letcher, B.H., 2002. Tag retention and survival of age-0 Atlantic salmon following surgical implantation with passive integrated transponder tags. *North American Journal of Fisheries Management* 22, 219–222.
- Herbinger, C.M., O'Reilly, P.T., Doyle, R.W., Wright, J.M., O'Flynn, F., 1999. Early growth performance of Atlantic salmon full-sib families reared in single family tanks versus in mixed family tanks. *Aquaculture* 173, 105–116.
- Ingram, B., 1994. Tagged fish and microchips. *Australian Fisheries* 53 (7), 29–32.
- Mahapatra, K.D., Gjerde, B., Reddy, P.V.G., Sahoo, M., Jana, R.K., Saha, J.N., Rye, M., 2001. Tagging: on the use of passive integrated transponder (PIT) tags for the identification of fish. *Aquaculture Research* 32, 47–50.
- Moffett, I.J.J., Crozier, W.W., Kennedy, J.A., 1997. A comparison of five external marks for Atlantic salmon, *Salmo salar* L. *Fisheries Management and Ecology* 4, 49–53.
- Montero, D., Robaina, L., Tort, L., Afonso, J.M., Fernández-Palacios, H., Izquierdo, M.L., 2001. Selective breeding for stress tolerance in gilthead seabream *Sparus aurata*. *Aquaculture (Orlando FL, USA)*.
- Prentice, E.L., Waknitz, F., Maynard, D.J., Sparks-McConkey, P., McCutcheon, C.S., Steffens, W., Jensen, A.L., Stuehrenberg, L.C., Downing, S.L., Sanford, B., Newcomb, T.W., Neff, D., 1989. "Study to Determine the Biological Feasibility of a New Fish Tagging System". Project No. 1983-31900, 193 electronic pages, (BPA Report DOE/BP-11982-4).
- Quartararo, N., Bell, J.D., 1992. Effect of intraperitoneal passive implantable transponder (PI) tags on the growth and survival of juvenile snapper, *Pagrus auratus* (Bloch and Schneider). *Aquaculture and Fisheries Management* 23, 543–548.
- Real, F.A., Oros, J., Acosta, F., Acosta, B., Santana, P., Deniz, S., 1997. Pasteurellosis of gilthead seabream (*Sparus aurata*) in Gran Canaria Island, Spain. *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists* 17 (5), 153–157.
- Roussel, J.M., Haro, A., Cunjak, R.A., 2000. Field test of a new method for tracking small fishes in shallow rivers using passive integrated transponder (PIT) technology. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 57, 1326–1329.

## *2. Navarro et al., 2008*

---



## Development of two new microsatellite multiplex PCRs for three sparid species: Gilthead seabream (*Sparus auratus* L.), red porgy (*Pagrus pagrus* L.) and redbanded seabream (*P. auriga*, Valenciennes, 1843) and their application to paternity studies

A. Navarro<sup>a</sup>, R. Badilla<sup>a</sup>, M.J. Zamorano<sup>a</sup>, V. Pasamontes<sup>a</sup>, S. Hildebrandt<sup>a</sup>, J.J. Sánchez<sup>b</sup>, J.M. Afonso<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Universidad de Las Palmas de Gran Canaria (ULPGC), Instituto Universitario de Sanidad Animal y Seguridad Alimentaria (IUSA), Grupo de Investigación en Acuicultura (GIA), Trasmontaña s/n, 35413, Arucas, Las Palmas, Spain

<sup>b</sup> Instituto Nacional de Toxicología y Ciencias Forenses, Campus de Ciencias de la Salud, La Cuesta 38320, La Laguna, Sta. Cruz de Tenerife, Spain

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 30 April 2008

Received in revised form 2 July 2008

Accepted 3 July 2008

#### Keywords:

Microsatellite

Multiplex PCR

Assignment

Gilthead seabream

Red porgy

Redbanded seabream

### ABSTRACT

This study reports two new and highly informative multiplex PCRs of microsatellite markers, with redesigned interspecific primer sets for three sparid species: gilthead seabream (*Sparus auratus* L.), red porgy (*Pagrus pagrus* L.) and redbanded seabream (*P. auriga*, Valenciennes, 1843). The evaluation and validation of the two multiplex PCRs, named RimA and RimB (Redesigned Interspecific Multiplex), were carried out upon: 148 individual gilthead seabream (66 breeders of unknown gender, and 82 of their descendents obtained by mass-spawning), 37 red porgy and 125 redbanded seabream. From 15 and 12 redesigned microsatellite markers for RimA and RimB, respectively, the number of markers included in the final multiplex PCRs were 10 in RimA and 7 in RimB for gilthead seabream, 6 in each multiplex PCR for red porgy and 8 in RimA and 5 in RimB for redbanded seabream. The a priori combined parental exclusion probability for each multiplex in the three species was 0.999. For gilthead seabream, it was possible to assign each offspring to a single parent pair (100% success) using the exclusion method with at least seven microsatellite markers for each multiplex PCR. Null alleles were found only for marker *PbMS2*, through familial segregation, with a frequency similar to the expected one (0.09 vs 0.14). Results revealed that the multiplex reaction no more than one-sixth the cost of single reactions even when these reactions were performed in a unique run, and that genotyping errors were minimized due to automation. These robust multiplex PCRs will be a fundamental tool for the industry to introduce selection programs and to manage their broodstocks under industrial conditions.

© 2008 Elsevier B.V. All rights reserved.

### 1. Introduction

Several sparid species, such as gilthead seabream, red porgy and redbanded seabream, are well established in consumers' eating habits. Gilthead seabream (*Sparus auratus* L.) is one of the most important species in Mediterranean aquaculture, with a production of 102,000 tons in 2005 and a production growth of 340% from 1996 to 2005 (FAO, 2007). Red porgy (*Pagrus pagrus* L.) and redbanded seabream (*P. auriga*, Valenciennes, 1843) constitute new species for European aquaculture, and have been cultured recently in the Mediterranean area, since they are well known and appreciated among consumers and have a production system that adapts well to farming conditions already established for other species like gilthead seabream.

To ensure production quality and quantity, these three species are propagated through mass-spawning. From a genetic point of view, this strategy shows the advantage that common environmental sources of variation are reduced thus raising the precision of the estimation of genetic parameters (Herbinger et al., 1999). However, it prevents

breeders from knowing the genealogy of fish under culture conditions, which is absolutely necessary in estimating genetic parameters and introducing selection programs.

Microsatellite markers are a powerful tool to reconstruct pedigree relationships among offspring of fish stocks for different species (Norris et al., 2000; Doyle et al., 2001; King et al., 2001; Castro et al., 2004). In sparid species, numerous microsatellite markers with a high polymorphism level have been described in gilthead seabream *S. auratus* (Batargias et al., 1999; Launey et al., 2003; Brown et al., 2005a; Senger et al., 2006), red seabream *P. major* (Takagi et al., 1997), snapper *P. auratus* (Adcock et al., 2000), blackspot seabream *Pagellus bogaraveo* (Stockley et al., 2000; Piñera et al., 2006) and common pandora *Pagellus erythrinus* (Ramšak et al., 2003), and redbanded seabream *P. auriga* (Ponce et al., 2006). The conservation of the microsatellite flanking regions among sparid species allows both interspecific amplification (Takagi et al., 1997; Oliva et al., 2005; Brown et al., 2005a; Jean et al., 2006; Piñera et al., 2006; Roques et al., 2006; Borrell et al., 2007; Castro et al., 2007) and use of multiplex PCRs.

The development of multiplex PCRs allows geneticists to reduce the economic costs per reaction (Neff et al., 2000; Wesmajervi et al.,

\* Corresponding author. Tel.: +34 928 459735; fax: +34 928 451142.

E-mail address: [jafonso@dpat.ulpgc.es](mailto:jafonso@dpat.ulpgc.es) (J.M. Afonso).

2006) and to optimize analyses of genealogy reconstruction and population genetic variability. However, the success of a new multiplex PCR requires evaluation and validation (Markoulatos et al., 2002) and an adequate number of markers to resolve parental assignment (Bernatchez and Duchesne, 2000). In sparids, several multiplex reactions have been proposed by combining exclusively specific microsatellite markers for each species and identical annealing temperatures. For gilthead seabream, Launey et al. (2003) proposed two multiplex reactions of three and five markers, while Brown et al. (2005a) proposed and checked the amplification of a multiplex PCR of four microsatellite markers. In common pandora, Ramšak et al. (2003) developed a multiplex PCR with three microsatellite markers by means of the touchdown technique.

The aim of this study is to develop two robust multiplex PCRs for a high number of polymorphic microsatellite markers for three sparid species (gilthead seabream, red porgy and redbanded seabream). The PCRs were worked out by redesigning primer sets from specific gilthead seabream microsatellite markers and interspecific markers for other sparids. The multiplexes will be useful for more agile and economic genotyping of broodstocks for the determination of familial relationships and for parental assignments of offspring from controlled mass-spawning. These multiplexes will be a fundamental tool for the industry to introduce selection programs and to manage their broodstocks with inbreeding criteria which at the same time does not interfere with the production system.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Samples

A total of 310 individuals were analysed. The 148 gilthead seabream individuals were 66 breeders of unknown gender of a broodstock kept in captivity, and 82 of their descendants obtained by mass-spawning. The 37 red porgy and 125 redbanded seabream samples came from broodstocks kept in the Canary Institute of Marine Sciences (Canary Islands, Spain).

DNA was extracted from fin tissue following the phenol-chloroform method described in Sambrook et al. (1989), and kept in TE buffer (Tris 0.01 mM and EDTA 0.001 mM, pH 8.0) at 4 °C. DNA quality and quantity were checked by means of electrophoresis in a 1% agarose gel (8 V cm<sup>-1</sup>) that was stained with ethidium bromide (0.5 µg µl<sup>-1</sup>) and then analysed with Quantity One 1-D Analysis Software, using Lambda HindIII as a molecular weight marker.

### 2.2. Multiplex PCR

#### 2.2.1. Redesigned primers

Two multiplex reactions, named RimA and RimB (Redesigned Interspecific Multiplex), were developed for the three species. In order to do so 27 microsatellite markers from different sparid species were used: 21 markers from gilthead seabream, *S. auratus* (Batargias et al., 1999; Launey et al., 2003; Brown et al., 2005a), two markers from red seabream, *P. major* (Takagi et al., 1997), one marker from red snapper, *P. auratus* (Adcock et al., 2000), and three markers from blackspot seabream, *P. bogaraveo* (Stockley et al., 2000). RimA and RimB were designed with 15 and 12 microsatellite markers, respectively (Table 1). The microsatellite markers were selected according to the polymorphism in natural and cultured populations (Oliva et al., 2005), linkage information (Dermitzakis et al., 1998; Launey et al., 2003; Franch et al., 2006), and sequence motif repeats to achieve sufficient variability. Also, the existence of flanking DNA sequences free from interfering polymorphisms, such as nucleotide substitutions in potential primer binding sites, was considered.

PCR primers were designed to give amplicon lengths in the range from 86 to 317 base pairs (bp). High complexity sequence was circumvented during primer design to ensure sensibility and specificity of the multiplex assay. The aim was to obtain a theoretical melting temperature of 60 °C ± 2 °C at a salt concentration (K<sup>+</sup>, Na<sup>+</sup>, Tris<sup>+</sup> or NH<sub>4</sub><sup>+</sup>) of 180 mM. A 35–60% GC content of the primer sequence was ensured, to avoid the primer being sited on palindromes or homopolymers such as poly (dT) of more than five bases. All primer candidates were analysed for hairpin or secondary structures using

**Table 1**

Loci names, fluorochromes, primer sequences and reference of each microsatellite marker

| Locus                      | Fluorochrome | Redesigned forward primer sequence (5'→3') | Redesigned reverse primer sequence (5'→3') | Reference               |
|----------------------------|--------------|--|--|-------------------------|
| <b>Multiplex RimA</b>      |              |  |  |                         |
| <i>SauK140INRA</i>         | 5' 6-FAM     | CATGGCAACGGGGTAGGT                         | GTATGCTTGAAGTGTATGTGTGTC                   | Launey et al. (2003)    |
| <i>Pma2b</i>               | 5' 6-FAM     | AGGTGAGGAGCAAGAGAGAGAG                     | GTTTCGACACTACCTTTCAC2TAAATCA               | Takagi et al. (1997)    |
| <i>SauD182INRA</i>         | 5' 6-FAM     | GTCTCACACCAGATTCAAGACAGTA                  | GTTTACTCTGTGTTTCATCTCATCTCG                | Launey et al. (2003)    |
| <i>SauG46INRA</i>          | 5' 6-FAM     | CAAGGTGTCCCGTGTCT                          | GTTTACTGCCAAGGTCAGAGTCACA                  | Launey et al. (2003)    |
| <i>SaGT32</i>              | 5' 6-FAM     | GAACACACACGCTGCATACAC                      | GTTTGTGAGGAGGTCAGAGGATAATG                 | Batargias et al. (1999) |
| <i>PbMS6</i>               | 5* NED       | TTATTCTACGACACACGACTGTG                    | GACACTGCAGCACAGACAGAC                      | Stockley et al. (2000)  |
| <i>SauH98INRA</i>          | 5* NED       | AACTTAGCAGGGGGAGGCTA                       | GTTTCACAAGTGTGCTGAAAGTACTGT                | Launey et al. (2003)    |
| <i>SauE97INRA</i>          | 5* NED       | CATGTGTAAATCGGTGAGTTAC                     | GTTTCGGTACCGGGGTCAAATA                     | Launey et al. (2003)    |
| <i>Sal12</i>               | 5* NED       | GTAACAATGGTAACGGGGAGTG                     | GTTTACCAGACAGAAAACCTGGAT                   | Brown et al. (2005a)    |
| <i>PaGA2a</i>              | 5* PET       | GACAGAGAGGGAGTGGATGTG                      | GTTTATCATCATCATCATCAGTCAGAGC               | Adcock et al. (2000)    |
| <i>SauH94INRA</i>          | 5* PET       | CTCTGTATGAAC2TAAACACAGACC                  | GTTTATAAATCTTGAGGCTGGACAGAAAG              | Launey et al. (2003)    |
| <i>SauD69INRA</i>          | 5* PET       | GTGTGAAATGGCGTTGATCC                       | GTTTGTGCTGATTTGAAACTCTGCTAAC               | Launey et al. (2003)    |
| <i>SauL47INRA</i>          | 5* VIC       | GCCAGCCAGGGTACGTC                          | GTTTCCATATCATTACACTGTGGCTA                 | Launey et al. (2003)    |
| <i>PbMS2<sup>a</sup></i>   | 5* VIC       | CTCGCGGTAGTGTTCACAGAGC                     | GCAACAATGGAGGGTTCGTCATC                    | Stockley et al. (2000)  |
| <i>SaGT26</i>              | 5* VIC       | ATATCACGCCTCTCAACCCGTATGTA                 | GCATCTAGGCCTATGTTGGTATTAG                  | Batargias et al. (1999) |
| <b>Multiplex RimB</b>      |              |  |  |                         |
| <i>SaGT31</i>              | 5' 6-FAM     | TGTGCTGTTCATTCCTCAGC                       | GCACCAGCAGTATTAAATCAGTTTC                  | Batargias et al. (1999) |
| <i>SauE82INRA</i>          | 5' 6-FAM     | ATGACTTGAACACACTTGGGAGT                    | GTTTGACCCCTAAGCATGTCCTCTTC                 | Launey et al. (2003)    |
| <i>PbMS16</i>              | 5' 6-FAM     | GGTCGGAGAGTCAAAAACAGT                      | GTTTAAATAGGACAGGGGCTAGTTTATCT              | Stockley et al. (2000)  |
| <i>Sal14</i>               | 5' 6-FAM     | TCACTATACAGCTACATGCATACAC                  | GTTTAGGACAAGAAGGAGAAAGAAATGAC              | Brown et al. (2005a)    |
| <i>SauANINRA</i>           | 5* NED       | AGGGTAAAGAGACACCACTAAGACA                  | GTTTCAGGGCAGAAACCATAATGCTA                 | Launey et al. (2003)    |
| <i>Sal19</i>               | 5* NED       | ATGAAGAATTTGTCTCGACTGCAC                   | GTTTCATCGAGTCTCTGGAATCAG                   | Brown et al. (2005a)    |
| <i>Sal15</i>               | 5* NED       | TGCTTTCTGTCCCTCACACTTAT                    | GTTTAGTGTGGAGTAAACACAGCCTCAGT              | Brown et al. (2005a)    |
| <i>SaGT41b<sup>a</sup></i> | 5* PET       | GGAGGCACTTGAAGTGCAG                        | AGATGGCAGAGGCTCTGGTAG                      | Batargias et al. (1999) |
| <i>Sal10</i>               | 5* PET       | GGACCAAGACTGCATAATAACAT                    | GGTGAGAATAATTAGCTCCCTATAGACC               | Brown et al. (2005a)    |
| <i>Sal21</i>               | 5* VIC       | ACCATGTTCACAAGCTGTGGTA                     | GTTTCAGCAAAGTTCAGCGAATTTG                  | Brown et al. (2005a)    |
| <i>SauL41INRA</i>          | 5* VIC       | GTGATTACAGGGTTAACCAGCAG                    | GTTTACAGCTTAACCTGTGATTAGCTTC               | Launey et al. (2003)    |
| <i>Pma1</i>                | 5* VIC       | CCAGTATTTCAATGTGCC2TTATG                   | GTTTCAGACTTGAAGAAACAGGAC                   | Takagi et al. (1997)    |

<sup>a</sup> Locus with original primer pair reported by authors.

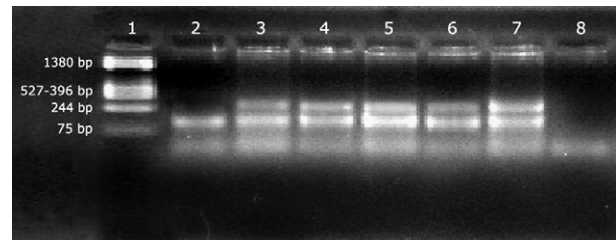
the software found at Integrated DNA Technologies (<http://www.idtdna.com/Scitools/Applications/mFold/>). Primer stable secondary structures around each microsatellite region were avoided (below the  $-13 \text{ kcal mol}^{-1}$  threshold of free energy) (Yuryev et al., 2002). Primer characteristics were chosen to ensure equal PCR amplification efficiency for all DNA fragments as previously described (Sánchez et al., 2003).

Before using all primers together in a multiplex PCR, each primer pair was tested individually on five samples of each species in order to corroborate correct amplification, allele size range and microsatellite identification. Those microsatellite markers that did not amplify individually were discarded from the multiplex reaction.

Initially,  $0.3 \mu\text{M}$  of each primer was used for both multiplexes. Primer concentrations were modified subsequently to obtain peak heights between 600 and 3000 relative fluorescent units (RFU) for each microsatellite marker. First, concentrations of primer pairs that amplified markers with high fluorescence were reduced and later those with low fluorescence were increased. These changes were made one by one with steps of  $0.01\text{--}0.05 \mu\text{M}$ . The total primer concentration was adjusted not to exceed  $0.7 \mu\text{M}$  at the end of the process. Each set-up was tested on five DNA samples for each multiplex reaction and species. The final primer sets of RimA and RimB in each species, and their concentrations, are reported in Table 2.

### 2.2.2. PCR conditions

PCR conditions consisted of an initial denaturation at  $94 \text{ }^\circ\text{C}$  for 10 min, followed by 30 cycles of  $94 \text{ }^\circ\text{C}$  for 30 s,  $60 \text{ }^\circ\text{C}$  for 1 min and  $72 \text{ }^\circ\text{C}$  for 1 min, with a final extension of  $65 \text{ }^\circ\text{C}$  for 80 min. Reactions were carried out in a final volume of  $12.5 \mu\text{l}$  with the following component concentrations: 1X GeneAmp PCR Buffer II (100 mM Tris-HCl pH 8.3, 500 mM KCl) (Applied Biosystem®), 3 mM  $\text{MgCl}_2$ , 0.2 mM of each dNTP,  $0.04 \mu\text{l } \mu\text{l}^{-1}$  AmpliTaq Gold DNA polymerase (Applied Biosystem®), 10–40 ng of DNA template, and  $0.01\text{--}0.19 \mu\text{M}$  of each primer. The assessment of DNA quantity was very important in order to obtain a successful multiplex PCR. Four quantities were initially tested on both multiplex PCRs: 3, 10, 20 and 40 ng. DNA quality was also important and, for this reason, when the template DNA was degraded or contained Taq polymerase inhibitors, use of BSA ( $0.8 \mu\text{g } \mu\text{l}^{-1}$ ) (Bovine



**Fig. 1.** Multiplex RimA in gilthead seabream on agarose gel (2%). Lane 1, weight molecular marker pGEM3Z cut with Hin FI. Lane 2, amplification from degraded template DNA. Lanes 3–7, adequate amplifications. Lane 8, negative control.

Serum Albumin) or DMSO (5%) as adjuvants was necessary to promote the multiplex PCR reaction (Henegariu et al., 1997).

### 2.3. Running conditions

Before running multiplex reactions in the automatic sequencer, an aliquot was checked on a 2% agarose gel for 30 min ( $8 \text{ v cm}^{-1}$ ) to check for the adequate amplification of multiplex amplicons in each species. In general, a good amplification of RimA shows two bands; a light one containing microsatellite amplicons from 60 to 200 bp and a heavy band having microsatellite amplicons from 210 to 300 bp, as shown in Fig. 1 (example of gilthead seabream samples). In RimB only a wider band was shown due to the wide allele size range for marker *Sal19* in gilthead seabream and marker *Pma1* in red porgy. For redbanded seabream, RimB showed no heavy band.

Later,  $1 \mu\text{l}$  of reaction product, diluted at 50% with Milli-Q water only for RimB, was mixed with  $9.75 \mu\text{l}$  of Hi-Di formamide and  $0.25 \mu\text{l}$  of GeneScan 500–250 LIZ (Applied Biosystem®) size standard and run on an ABI Prism 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystem®) with 36 cm capillary arrays and POP-4 polymer (Applied Biosystem®) ( $60 \text{ }^\circ\text{C}$ , 3000 v, 1500 s). Electropherograms and genotypes were evaluated with GeneScan (v3.7) and Genotyper (v3.7) (Applied Biosystems, Inc.) softwares.

### 2.4. Data analysis

The Hardy–Weinberg equilibrium test, the Exclusion Probability and the Combined Exclusion Probability, both for the option parent pair (Jamieson and Taylor, 1997), the observed and expected heterozygosity and the theoretical frequency of null alleles (Summers and Amos, 1996) were estimated with Cervus 3.0 (Kalinowski et al., 2007). Familial assignments for gilthead seabream were determined using the exclusion method (unknown gender), with a non-commercial software provided by Dr. J. Fernández (INIA-Madrid, Spain).

## 3. Results

RimA and RimB were highly robust multiplex PCRs for all three sparid species. Fifteen and twelve microsatellite markers were initially used for RimA and RimB respectively (Table 1). In Table 2, the microsatellite markers finally included in each multiplex and species are reported. In gilthead seabream, ten microsatellite markers amplified adequately in RimA and seven in RimB. Marker *SauD69INRA* amplified well in both multiplexes. For this reason, for gilthead seabream, RimA and RimB can be used with ten and seven or nine and eight microsatellite markers, respectively. Thus, it can be amplified as internal control in both multiplexes. Markers *SaGT26*, *Sal15*, *Pma1* and *PbM16* worked individually but not in combination with others and were therefore not included in multiplex reactions. In red porgy, *SauD69INRA*, initially included in RimA, did not show the expected amplification quality and it was changed to RimB. So, six microsatellite markers amplified in each multiplex PCR for this species. Markers

**Table 2**

Final concentration of each microsatellite marker primer ( $\mu\text{M}$ ), in both multiplex reactions, for gilthead seabream, red porgy and redbanded seabream

| Locus                          | Concentration ( $\mu\text{M}$ ) of each primer |           |                    |
|--------------------------------|--|-----------|--------------------|
|                                | Gilthead seabream                              | Red porgy | Redbanded seabream |
| <b>Multiplex RimA</b>          |  |           |                    |
| <i>SauK140INRA</i>             | 0.05   |           |                    |
| <i>SauD182INRA</i>             | 0.06   |           |                    |
| <i>SauH98INRA</i>              | 0.08   | 0.09      | 0.06               |
| <i>SaGT32</i>                  | 0.09   |           | 0.06               |
| <i>PbMS2</i>                   | 0.06   | 0.10      | 0.10               |
| <i>SauI47INRA</i>              | 0.06   | 0.04      | 0.02               |
| <i>Sal12</i>                   | 0.06   | 0.17      | 0.06               |
| <i>PaGA2a</i>                  | 0.08   | 0.09      | 0.06               |
| <i>SauH94INRA</i>              |  | 0.06      | 0.06               |
| <i>SauG46INRA</i>              | 0.06   |           | 0.04               |
| <i>SauD69INRA</i> <sup>a</sup> | 0.05   |           |                    |
| <b>Multiplex RimB</b>          |  |           |                    |
| <i>SaGT31</i>                  | 0.05   |           |                    |
| <i>SauE82INRA</i>              | 0.06   | 0.01      | 0.08               |
| <i>Sal14</i>                   | 0.09   |           |                    |
| <i>SauANINRA</i>               | 0.06   |           |                    |
| <i>Sal19</i>                   | 0.08   |           |                    |
| <i>Sal15</i>                   |  | 0.14      | 0.12               |
| <i>SaGT41b</i>                 | 0.10   | 0.07      | 0.13               |
| <i>SauI41INRA</i>              | 0.07   | 0.06      | 0.17               |
| <i>Pma1</i>                    |  | 0.16      | 0.04               |

<sup>a</sup> This marker also amplifies in RimB in gilthead seabream (at  $0.07 \mu\text{M}$ ) and red porgy (at  $0.19 \mu\text{M}$ ).

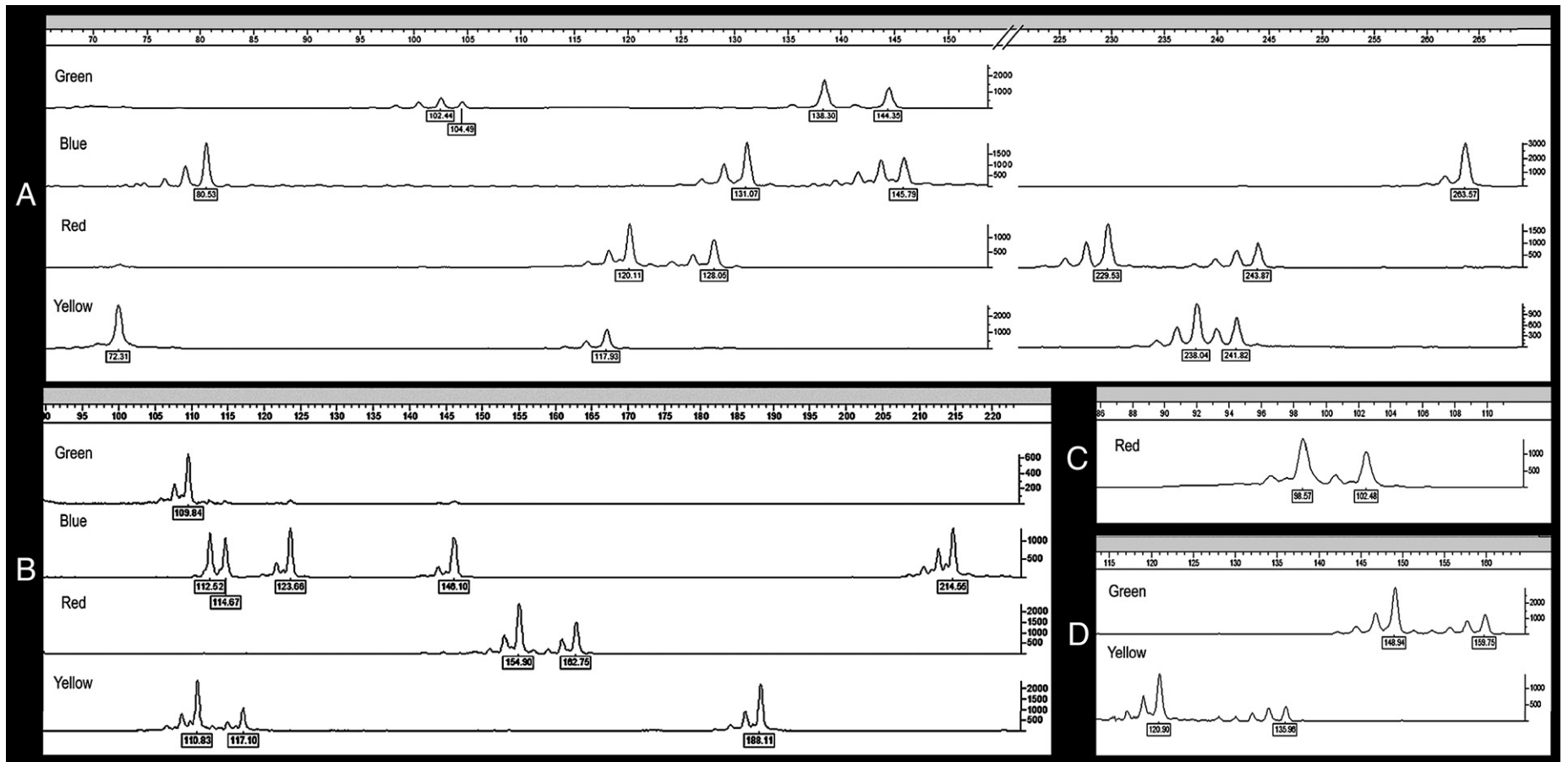


Fig. 2. Allele morphology of microsatellite markers in multiplexes RimA and RimB: a) RimA in gilthead seabream, b) RimB in gilthead seabream, c) *SauH94INRA* in RimA of red porgy, d) *Pma1* and *Sal15* in RimB of red porgy.

**Table 3**  
Number of alleles, size range, observed and expected heterozygosity, exclusion probability, combined exclusion probability and real assignment in both multiplex reactions for gilthead seabream

| Locus                 | Allele size range in bp (number of alleles) | Observed heterozygosity | Expected heterozygosity | Exclusion probability (%) | Accumulated combined exclusion probability (%) <sup>a</sup> | Accumulated real assignment (%) <sup>a</sup> |
|-----------------------|---|-------------------------|-------------------------|---------------------------|---|--|
| <b>Multiplex RimA</b> |   |                         |                         |                           |   |  |
| <i>SauD69INRA</i>     | 222–268 (18)                                | 0.85                    | 0.92                    | 94.8                      | 92.10   | 0  |
| <i>SaGT32</i>         | 146–182 (14)                                | 0.83                    | 0.87                    | 89.0                      | 99.13   | 6.10   |
| <i>PbMS2</i>          | 126–165 (11)                                | 0.82                    | 0.86                    | 86.8                      | 99.88   | 34.15  |
| <i>Sal12</i>          | 220–264 (12)                                | 0.79                    | 0.84                    | 84.9                      | 99.98   | 62.20  |
| <i>PaGA2a</i>         | 114–142 (10)                                | 0.86                    | 0.84                    | 85.0                      | 100   | 87.80  |
| <i>SauK140INRA</i>    | 66–100 (11)                                 | 0.79                    | 0.83                    | 83.3                      | 100   | 97.56  |
| <i>SauG46INRA</i>     | 110–134 (9)                                 | 0.65                    | 0.81                    | 79.3                      | 100   | 100  |
| <i>SauD182INRA</i>    | 250–270 (7)                                 | 0.70                    | 0.73                    | 68.2                      | 100   | 100  |
| <i>SauI47INRA</i>     | 88–106 (7)                                  | 0.70                    | 0.63                    | 57.5                      | 100   | 100  |
| <i>SauH98INRA</i>     | 108–122 (4)                                 | 0.36                    | 0.34                    | 29.4                      | 100   | 100  |
| <b>Multiplex RimB</b> |   |                         |                         |                           |   |  |
| <i>SauI41INRA</i>     | 86–162 (21)                                 | 0.71                    | 0.91                    | 94.1                      | 94.13   | 0  |
| <i>Sal14</i>          | 200–240 (12)                                | 0.92                    | 0.91                    | 93.4                      | 99.61   | 0  |
| <i>SaGT41b</i>        | 142–196 (16)                                | 0.94                    | 0.90                    | 93.1                      | 99.97   | 36.59  |
| <i>Sal19</i>          | 184–212 (8)                                 | 0.79                    | 0.82                    | 82.1                      | 100   | 59.76  |
| <i>SauE82INRA</i>     | 120–150 (9)                                 | 0.83                    | 0.81                    | 79.8                      | 100   | 78.05  |
| <i>SauANINRA</i>      | 111–119 (5)                                 | 0.77                    | 0.70                    | 62.8                      | 100   | 92.68  |
| <i>SaGT31</i>         | 112–118 (4)                                 | 0.62                    | 0.59                    | 49.0                      | 100   | 100  |

<sup>a</sup> Values obtained by adding a new marker each time.

*SaGT32*, *SaGT31* and *SauANINRA* were not included in multiplexes since they were monomorphic. In redbanded seabream, eight microsatellite markers amplified adequately in RimA and five in RimB.

The allele morphology of each microsatellite marker was similar among the studied species (Fig. 2). Concerning tested template DNA concentrations, the optimum DNA template quantity in RimA was established between 10 and 20 ng, while in RimB it was between 20 and 40 ng. The lowest quantities were not enough to guarantee a clear genotyping of all microsatellite markers in both multiplex reactions, while the highest quantity (40 ng for RimA) produced interaction effect among fluorochromes, minimizing ability to score genotypes.

The genetic diversity metrics for each microsatellite marker are shown in Tables 3, 4 and 5 for each species. In gilthead seabream, all markers were in Hardy–Weinberg equilibrium, except *SauI41INRA* which showed a lower observed heterozygosity than the expected one, although it exhibited the highest number of alleles. In red porgy, markers *SauI41INRA*, *Sal12* and *Sal15* were in disequilibrium due to a deficit of heterozygotes. This disequilibrium was higher for *Sal12*, and related to small sample size and high number of alleles. In redbanded seabream, markers *SauG46INRA* and *SauH94INRA* reported a lower observed heterozygosity than expected, and a low number of alleles.

**Table 4**  
Number of alleles, size range, observed and expected heterozygosity and exclusion probability in both multiplex reactions for red porgy

| Locus                 | Allele size range in bp (number of alleles) | Observed heterozygosity | Expected heterozygosity | Exclusion probability (%) |
|-----------------------|---|-------------------------|-------------------------|---------------------------|
| <b>Multiplex RimA</b> |   |                         |                         |                           |
| <i>Sal12</i>          | 220–260 (16)                                | 0.25                    | 0.92                    | 94.6                      |
| <i>SauI47INRA</i>     | 79–114 (15)                                 | 0.97                    | 0.91                    | 93.5                      |
| <i>PaGA2a</i>         | 96–128 (14)                                 | 0.77                    | 0.91                    | 93.3                      |
| <i>SauH98INRA</i>     | 98–132 (11)                                 | 0.81                    | 0.85                    | 85.9                      |
| <i>PbMS2</i>          | 129–162 (9)                                 | 0.94                    | 0.84                    | 83.4                      |
| <i>SauH94INRA</i>     | 159–185 (10)                                | 0.74                    | 0.75                    | 75.7                      |
| <b>Multiplex RimB</b> |   |                         |                         |                           |
| <i>Pma1</i>           | 149–247 (29)                                | 0.94                    | 0.96                    | 97.9                      |
| <i>Sal15</i>          | 105–157 (20)                                | 0.74                    | 0.95                    | 97.2                      |
| <i>SauI41INRA</i>     | 84–128 (16)                                 | 0.84                    | 0.92                    | 94.4                      |
| <i>SauE82INRA</i>     | 110–160 (11)                                | 0.78                    | 0.80                    | 78.8                      |
| <i>SaGT41b</i>        | 135–153 (8)                                 | 0.93                    | 0.80                    | 77.8                      |
| <i>SauD69INRA</i>     | 210–218 (4)                                 | 0.63                    | 0.57                    | 49.6                      |

The theoretical frequencies of null alleles (Summers and Amos, 1996) for all markers ranged from  $-0.17$  to  $+0.14$  with a mean of  $-0.03$  for gilthead seabream, from  $-0.09$  to  $+0.57$  (mean value  $+0.05$ ) for red porgy, and from  $-0.08$  to  $+0.28$  (mean value  $+0.02$ ) for redbanded seabream. The real frequency of null alleles, estimated through familial segregation for gilthead seabream, was  $+0.01$  when all loci of the two multiplexes were considered. This value was  $+0.09$  for the only locus in which null alleles were present, *PbMS2*, whose theoretical value was  $+0.14$ .

The a priori combined parental exclusion probabilities were very high for both multiplexes. In all three species, the values were 0.999. In gilthead seabream, it was possible to estimate the parental assignment percentage for a population of parents and offspring coming from mass-spawning. With this aim, markers reported in Table 3 were arranged from highest to lowest expected heterozygosity and several assignment tests and combined exclusion probability estimations were done including a new marker each time. The theoretical and real assignment values differed considerably when only a few markers were used. Results showed the need of at least seven microsatellite markers for each multiplex, in order to assign all the offspring, although theoretically this should be possible with only five markers in RimA and four in RimB.

**Table 5**  
Number of alleles, size range, observed and expected heterozygosity and exclusion probability in both multiplex reactions for redbanded seabream

| Locus                 | Allele size range in bp (number of alleles) | Observed heterozygosity | Expected heterozygosity | Exclusion probability (%) |
|-----------------------|---|-------------------------|-------------------------|---------------------------|
| <b>Multiplex RimA</b> |   |                         |                         |                           |
| <i>PbMS2</i>          | 138–177 (10)                                | 0.74                    | 0.82                    | 81.7                      |
| <i>SauH94INRA</i>     | 164–176 (6)                                 | 0.37                    | 0.67                    | 53.7                      |
| <i>PaGA2a</i>         | 94–112 (8)                                  | 0.66                    | 0.59                    | 48.9                      |
| <i>SauI47INRA</i>     | 74–84 (6)                                   | 0.53                    | 0.56                    | 38.8                      |
| <i>Sal12</i>          | 210–228 (6)                                 | 0.48                    | 0.49                    | 41.5                      |
| <i>SauH98INRA</i>     | 104–116 (4)                                 | 0.26                    | 0.24                    | 21.1                      |
| <i>SaGT32</i>         | 138–148 (4)                                 | 0.16                    | 0.17                    | 16.1                      |
| <i>SauG46INRA</i>     | 79–81 (2)                                   | 0.02                    | 0.02                    | 1.6                       |
| <b>Multiplex RimB</b> |   |                         |                         |                           |
| <i>SauI41INRA</i>     | 100–134 (12)                                | 0.83                    | 0.90                    | 92.3                      |
| <i>SauE82INRA</i>     | 126–173 (21)                                | 0.85                    | 0.89                    | 92.6                      |
| <i>SaGT41b</i>        | 153–177 (8)                                 | 0.74                    | 0.66                    | 61.4                      |
| <i>Sal15</i>          | 101–105 (3)                                 | 0.25                    | 0.25                    | 19.3                      |
| <i>Pma1</i>           | 155–159(3)                                  | 0.10                    | 0.10                    | 9.0                       |



#### 4. Discussion

Sparid species culture is generally performed through mass-spawning of about 40–60 breeders where parent–offspring relationships are unknown. For this reason, the introduction of breeding programs in this kind of industrial production systems needs a combination of both physical tagging and genetic identification of the cultured fish (Wesmajervi et al., 2006). In sparids, it is possible to physically identify fingerlings through VIE (Astorga et al., 2005) and PIT tagging systems (Navarro et al., 2006). It is also possible to reconstruct parent–offspring relationships analyzing enough microsatellite markers (Batargias et al., 1999; Castro et al., 2007; Jeong et al., 2007) that can be combined in multiplex PCRs to reduce costs (Neff et al., 2000). The correct inference of genealogy in genetic programs is very important since they determine the estimation of genetic parameters and the genetic evaluation of breeders (Dodds et al., 2005). Furthermore, the determination of parentage is also necessary to assist with within-family selection and to plan matings in broodstocks in order to avoid inbreeding. Genotyping errors and mutation rates are factors influencing parentage assignments (Jones and Ardren, 2003; Bonin et al., 2004). Thus, the usefulness of microsatellite marker multiplex reactions by means of fluorescent labelling depends partly on the electropherogram since different kinds of backgrounds may appear that can induce errors in the interpretation of the genotypes, like stutter peaks, pull-up peaks or non-specific artifact peaks (Selkoe and Toonen, 2006). The identification of these peaks is a key for a correct scoring of genotypes. In this sense, for RimA, markers *SauH98INRA* and *Sal12*, both marked with NED, showed a 72 bp peak for all three species (Fig. 2a). However, it is an artifact peak, since it also appears in the negative control and disappears when the markers are amplified separately.

The viability of cross-species amplification is well known both in simple (Roces et al., 2006; Yang et al., 2006; Borrell et al., 2007) and in multiplex microsatellite marker reactions (Paterson et al., 2004). This seems to be related to the existence of conserved regions flanking the microsatellite markers among groups of species (Presa and Guyomard, 1996; Rogers et al., 2004). In sparid species, very few multiplex reactions have been described regarding the number of microsatellite markers and their usefulness for different groups of species. In common pandora, Ramšak et al. (2003) developed a multiplex PCR with three markers using the touchdown technique. In gilthead seabream, Launey et al. (2003) described two multiplex reactions with specific markers, one of them with three (*SauI47INRA*, *SauK140INRA*, *SauD182INRA*) and another with five markers (*SauANINRA*, *SauE82INRA*, *SauE97INRA*, *SaGT26*, *SaGT31*), but they neither specified the amplification conditions nor tested their usefulness on other sparid species. Brown et al. (2005a) described a multiplex reaction with four gilthead seabream-specific markers (*Sal12*, *Sal14*, *Sal19*, *Sal21*), its amplification conditions and its validity for other five sparid species (*Dentex dentex*, *P. pagrus*, *Spondyliosoma cantharus*, *Diplodus sargus*, *Lithognathus mormyrus*). In this study, two multiplex reactions were designed for three phylogenetically closely related species (Hanel and Sturmbauer, 2000; Herran et al., 2001; Day, 2002). They contain some markers from the reactions previously developed by Launey et al. (2003) and Brown et al. (2005a) and others described for several sparid species (Takagi et al., 1997; Batargias et al., 1999; Adcock et al., 2000; Stockley et al., 2000), but the primers were redesigned with the aim of maximizing the number of markers per multiplex reaction and minimizing the familial assignment cost under industrial conditions of mass-spawning. The results obtained highlight the interspecific viability of both multiplex reactions for the three sparid species tested in the study. In fact, among markers that finally constituted RimA and RimB (Table 2), 85% of them worked well for gilthead seabream, 60% for red porgy and 65% for redbanded seabream. Five markers of RimA and three of RimB amplified in all three species, which represents a cross-species hybridation success.

This contrasts with the results obtained by Brown et al. (2005a) who describe a lower success in the cross-species amplification in five other sparids. This means that the tetraplex they designed for gilthead seabream was reduced to a duplex since only markers *Sal12* and *Sal19* showed cross-amplification in two species, *D. sargus* and *L. mormyrus*.

A handicap of interspecific microsatellite markers are null alleles, in single or multiplex reactions, because they cause false exclusions when null heterozygotes are considered as homozygotes (Callen et al., 1993). A method to identify the presence of null alleles is detecting an excess of homozygotes under the Hardy–Weinberg model (Marshall et al., 1998). In this study, for gilthead seabream, null alleles were only found at *PbMS2* with a frequency similar to the expected (0.09 vs 0.14). However, this locus was not in Hardy–Weinberg disequilibrium possibly, due to the fact that the frequency of the null allele was low. For the other two species, highest expected null allele frequencies were found for *Sal12* (0.57) and *Sal15* (0.12) in red porgy and for *SauH94INRA* (0.28) in redbanded seabream. In these three cases, Hardy–Weinberg disequilibrium was observed, suggesting that null alleles are present.

In genetic improvement, it is important to determine an adequate number of markers for an efficient and low-cost parental assignment (Bernatchez and Duchesne, 2000). These authors and Villanueva et al. (2002) propose simulation methods for the estimation of the number of loci based on parameters like population size and allelic diversity. In this study, a 100% success in paternity inference was obtained when at least seven microsatellite markers from RimA or RimB were used in gilthead seabream (Table 3). These results are in agreement with predictions made through the simulation methods of Bernatchez and Duchesne (2000) and Villanueva et al. (2002). Moreover, the high number of microsatellite markers included in RimA and RimB (ten and seven, respectively) ensure their usefulness in different situations such as a high number of breeders contributing to spawning (Blouin et al., 1996; Liu and Cordes, 2004), increasing homozygosity (Marshall et al., 1998), or cases where null alleles are present (Castro et al., 2007). When only a few microsatellite markers were used, the presence of null alleles produced incorrect assignments (single or several false parental couples) and unassigned offspring. By contrast, the increase of microsatellite markers only produced unassigned offspring. In fact, when using RimA in gilthead seabream, 14.6% of offspring remained initially unassigned due to the presence of null alleles. Each of these individuals could be assigned to a couple of parents when a single error was allowed in the exclusion method. When recognized, null alleles were manually recoded as recommended by Jones and Ardren (2003), and a 100% assignment success was achieved. In the same way, Castro et al. (2007) reported for gilthead seabream, a total assignment of offspring using eleven microsatellite markers in single PCRs, despite finding null alleles at five loci with frequencies ranging from 0.005 to 0.084. With the aim of reducing experimental costs, these authors recommend five of the eleven markers (*SaGT1*, *SaGT26*, *SaGT41a*, *PbMS2* and *PbMS16*) due to their high polymorphism, easy genotyping and absence of null alleles. Nevertheless, the presence or absence of null alleles for a particular marker is a characteristic of each population, as demonstrated by observation in this study that *PbMS2* was the only marker that showed null alleles.

The development of multiplex reactions presents the main advantage of optimizing the cost–effectiveness ratio (Wesmajervi et al., 2006), without forfeiting genotyping consistency and band resolution (Neff et al., 2000). Renshaw et al. (2006) reported a lower material cost of multiplex reactions versus single ones. These authors showed that the genotyping of a sample on tetraplex or octaplex reactions was 3.5 and 6.7 times less than individual genotyping, respectively. They also reported similar saving values in personnel time. Neff et al. (2000) required one-fourth the PCR consumables for genotyping four microsatellite markers with a tetraplex reaction than with single ones. In this study, the personnel, consumable and running costs of genotyping with ten microsatellite markers in a multiplex PCR was compared

with separate PCRs. Results revealed that the multiplex reaction was no more than one-sixth that of single reactions even when these were performed in a unique run. These data are interesting in order to stimulate selection strategies in the seabream production industry, and because their implementation does not require any modifications in production systems. The described multiplex PCRs could also be used in QTL determination, and MAS selection (Frey et al., 2004), otherwise, costs would be very high—even more after considering that they were designed considering the linkage distances.

On the other hand, multiplex reactions also minimize genotyping errors since they reduce steps during the sample analysis process and introduce automation. Bonin et al. (2004) analysed twice eighteen microsatellite markers with single PCR on 34 samples of brown bear, and reported a 0.8% of genotyping errors due to human factors. The authors concluded that an important recommendation for limiting genotyping errors was the automation of laboratory work. In this way, multiplex PCR reduces the risk of contamination and avoids the mix of genotypes from different samples, as noted in the total assignment of gilthead seabream offspring (100%) in this study. Moreover, the amplification of marker *SauD69INRA* in both multiplexes (RimA and RimB), in gilthead seabream, is useful as an internal control for allele calling and for minimizing genotyping errors, as is widely done for forensic multiplex systems.

Effective population sizes in commercial gilthead seabream broodstocks are low due to its high fecundity, high variance in family size and fewer males than females contributing in each mass-spawning (Brown et al., 2005b). Nevertheless, mean heterozygosity in gilthead seabream is high, although slightly lower than in natural populations (Batargias et al., 1999; Alarcón et al., 2004; Brown et al., 2005a; Blanco et al., 2007), and very similar to that found in this study. Also, mean expected heterozygosities for RimA and RimB were high for red porgy and redbanded seabream. Therefore, for both multiplex PCRs, a very high a priori combined exclusion probability was estimated in the three species. Although these values are overestimated when compared with real assignment in gilthead seabream, theoretical and real values converge to a 100% of assignment from seven microsatellite markers, suggesting similar results would be likely for the other two sparid species.

## Acknowledgments

The authors are grateful to Dr. Jesús Fernández for providing the non-commercial software for paternity assignment by exclusion method. We also acknowledge the comments of Dr. Hulata and two anonymous referees, which have produced a highly readable text. This study was supported by the Canaries Government (PI2002/212, PI042004/119) and JACUMAR (Junta Asesora de Cultivos Marinos) projects.

## References

- Adcock, G.J., Bernal Ramírez, J.H., Hauser, L., Smith, P., Carvalho, G.R., 2000. Screening of DNA polymorphisms in samples of archived scales from New Zealand snapper. *J. Fish Biol.* 56, 1283–1287.
- Alarcón, J.A., Magoulas, A., Georgakopoulos, T., Zouros, E., Alvarez, M.C., 2004. Genetic comparison of wild and cultivated European populations of the gilthead sea bream (*Sparus aurata*). *Aquaculture* 230, 65–80.
- Astorga, N., Afonso, J.M., Zamorano, M.J., Montero, D., Oliva, V., Fernández-Palacios, H., Izquierdo, M.S., 2005. Evaluation of visible implant elastomer tags for tagging juvenile gilthead seabream (*Sparus auratus* L.); effects on growth, mortality, handling time and tag loss. *Aquacult. Res.* 36, 733–738.
- Batargias, C., Dermitzakis, E., Magoulas, A., Zouros, E., 1999. Characterization of six polymorphic microsatellite markers in gilthead seabream, *Sparus aurata*. *Mol. Ecol.* 8, 897–898.
- Bernatchez, L., Duchesne, P., 2000. Individual-based genotype analysis in studies of parentage and population assignment: how many loci, how many alleles? *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 57, 1–12.
- Blanco, G., Borrell, Y.J., Bernardo, D., Vázquez, E., Asturiano, J.F., Sánchez, J.A., Sánchez, J.A., 2007. The use of microsatellites for optimizing broodstocks in a hatchery of gilthead seabream (*Sparus aurata* L.). *Aquaculture* 272, S1–S246.
- Blouin, M.S., Parsons, M., Lacaile, V., Lotz, S., 1996. Use of microsatellite loci to classify individuals by relatedness. *Mol. Ecol.* 5, 393–401.
- Bonin, A., Bellemain, E., Eidesen, P.B., Papanon, F., Brochmann, C., Taberlet, P., 2004. How to track and assess genotyping errors in population genetic studies. *Mol. Ecol.* 13, 3261–3273.
- Borrell, Y.J., Carleos, C.E., Asturiano, J.F., Bernardo, D., Vázquez, E., Corral, N., Sánchez, J.A., Blanco, G., 2007. Use of microsatellites and a combinatorial optimization approach in the acquisition of gilthead seabream (*Sparus aurata* L.) broodstocks for hatcheries. *Aquaculture* 269, 200–210.
- Brown, R.C., Tsalavouta, M., Terzoglou, V., Magoulas, A., McAndrew, B.J., 2005a. Additional microsatellites for *Sparus aurata* and cross-species amplification within the Sparidae family. *Mol. Ecol.* 5, 605–607.
- Brown, R.C., Woolliams, J.A., McAndrew, B.J., 2005b. Factors influencing effective population size in commercial populations of gilthead seabream, *Sparus aurata*. *Aquaculture* 247, 219–225.
- Callen, D.F., Thompson, A.D., Shen, Y., Phillips, H.A., Richards, R.I., Mulley, J.C., 1993. Incidence and origin of null alleles in the (AC)<sub>n</sub> microsatellite markers. *Am. J. Hum. Genet.* 52, 922–927.
- Castro, J., Bouza, C., Presa, P., Pino-Querido, A., Rianza, A., Ferrerio, I., Sanchez, L., Martinez, P., 2004. Potential sources of error in parentage assessment of turbot (*Scophthalmus maximus*) using microsatellite loci. *Aquaculture* 242, 119–135.
- Castro, J., Pino, A., Hermida, M., Bouza, C., Chavarrias, D., Merino, P., Sánchez, L., Martínez, P., 2007. A microsatellite marker tool for parentage assessment in gilthead seabream (*Sparus aurata*). In: Vandeputte, M., Chatain, B., Hulata, G. (Eds.), *Genetics in Aquaculture: Proceedings of the Ninth International Symposium*, 26–30 June 2006, Montpellier, France. *Aquaculture*, vol. 272, pp. 210–216. Supplement 1.
- Day, J.J., 2002. Phylogenetic relationships of the Sparidae (Teleostei: Percoidae) and implications for convergent trophic evolution. *Biol. J. Linn. Soc.* 76, 269–301.
- Dermitzakis, E.T., Clark, A.G., Batargias, C., Magoulas, A., Zouros, E., 1998. Negative covariance suggests mutation bias in a two-locus microsatellite system in fish *Sparus aurata*. *Genetics* 150, 1567–1575.
- Dodds, K.G., Tate, M.L., Sise, J.A., 2005. Genetic evaluation using parentage information from genetic markers. *J. Anim. Sci.* 83, 2271–2279.
- Doyle, R.W., Perez-Enriquez, R., Takagi, M., Taniguchi, N., 2001. Selective recovery of founder genetic diversity in aquacultural broodstocks and captive, endangered fish populations. *Genetica* 111, 191–304.
- FAO, 2007. <http://www.fao.org>.
- Franch, R., Louro, B., Tsalavouta, M., Chatziplis, D., Tsigonopoulos, C.S., Sarpoulou, E., Antonello, J., Magoulas, A., Mylonas, C.C., Babbucci, M., Patarnello, T., Power, D.M., Kotoulas, G., Bargelloni, L., 2006. A genetic linkage map of the hermaphrodite teleost fish *Sparus aurata* L. *Genetics* 174, 851–861.
- Frey, J.E., Frey, B., Sauer, C., Kellerhals, M., 2004. Efficient low-cost DNA extraction and multiplex fluorescent PCR method for marker-assisted selection in breeding. *Plant Breed.* 123, 554–557.
- Hanel, R., Sturmbauer, C., 2000. Multiple recurrent evolution of trophic types in northeastern Atlantic and Mediterranean seabreams (Sparidae, Percoidae). *J. Mol. Evol.* 50, 276–283.
- Henegariu, O., Heerema, N.A., Dlouhy, S.R., Vance, G.H., Vogt, P.H., 1997. Multiplex PCR: Critical parameters and step-by-step protocol. *BioTechniques* 23, 504–511.
- Herbinger, C.M., O'Reilly, P.T., Doyle, R.W., Wright, J.M., O'Flynn, F., 1999. Early growth performance of Atlantic salmon full-sib families reared in single family tanks versus in mixed family tanks. *Aquaculture* 173, 105–116.
- Herran, R., Rejon, C.R., Rejon, M.R., Garrido-Ramos, M.A., 2001. The molecular phylogeny of the Sparidae (Pisces, Perciformes) based on two satellite DNA families. *Heredity* 87, 691–697.
- Jamieson, A., Taylor, S.C.S., 1997. Comparisons of three probability formulae for parentage exclusion. *Anim. Genet.* 28, 397–400.
- Jean, C.T., Lee, S.C., Liu, C.W., Tseng, M.C., 2006. Isolation and characterization of eight microsatellite loci from Picnic seabream (*Acanthopagrus berda*). *Mol. Ecol. Notes* 6, 1269–1271.
- Jeong, D.S., González, E.B., Morishima, K., Arai, K., Umino, T., 2007. Parentage assignment of stocked black sea bream *Acanthopagrus schlegelii* in Hiroshima Bay using microsatellite DNA markers. *Fish. Sci.* 73, 823–830.
- Jones, A.G., Ardren, W.R., 2003. Methods of parentage analysis in natural populations. *Mol. Ecol.* 12, 2511–2523.
- Kalinowski, S.T., Taper, M.L., Marshall, T.C., 2007. Revising how the computer program CERVUS accommodates genotyping error increases success in paternity assignment. *Mol. Ecol.* 16, 1099–1106.
- King, T.L., Kalinowski, S.T., Schill, W.B., Spidle, A.P., Lubinski, B.A., 2001. Population structure of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.): a range-wide perspective from microsatellite DNA variation. *Mol. Ecol.* 10, 807–821.
- Launey, S., Krieg, F., Haffray, P., Bruant, J.S., Vanniers, A., Guyomard, R., 2003. Twelve new microsatellite markers for gilthead seabream (*Sparus aurata* L.): characterization, polymorphism and linkage. *Mol. Ecol.* 3, 457–459.
- Liu, Z.J., Cordes, J.F., 2004. DNA marker technologies and their applications in aquaculture genetics. *Aquaculture* 238, 1–37.
- Markoulatos, P., Sifafakas, N., Moncany, M., 2002. Multiplex polymerase chain reaction: a practical approach. *J. Clin. Lab. Anal.* 16, 47–51.
- Marshall, T.C., Slate, J., Kruuk, L.E.B., Pemberton, J.M., 1998. Statistical confidence for likelihood-based paternity inference in natural populations. *Mol. Ecol.* 7, 639–655.
- Navarro, A., Oliva, V., Zamorano, M.J., Ginés, R., Izquierdo, M.S., Astorga, N., Afonso, J.M., 2006. Evaluation of PIT system as method to tag fingerlings of gilthead seabream (*Sparus auratus* L.): effects on growth, mortality and tag loss. *Aquaculture* 257, 309–315.
- Neff, B.D., Fu, P., Gross, M.R., 2000. Microsatellite multiplexing in fish. *Trans. Amer. Fish. Soc.* 129, 584–593.

- Norris, A., Bradley, D., Cunningham, E., 2000. Parentage and relatedness determination in farmed Atlantic salmon (*S. salar*) using microsatellite markers. *Aquaculture* 182, 73–83.
- Oliva, V., Zamorano, M.J., Astorga, N., Ginés, R., Navarro, A., Cavari, B., Funkenstein, B., Afonso, J.M., 2005. Microsatellite diversity in natural populations of *Sparus aurata* using interspecific and intraspecific markers. In: Neira, R., Diaz, N. (Eds.), *Genetics in Aquaculture VIII. Proceedings of the Eighth International Symposium*, 9–15 November 2003, Puerto Varas, Chile. *Aquaculture*, vol. 247, p. 27.
- Paterson, S., Piertney, S.B., Knox, D., Gilbey, J., Verspoor, E., 2004. Characterization and PCR multiplexing of novel highly variable tetranucleotide Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) microsatellites. *Mol. Ecol. Notes* 4, 160–162.
- Piñera, J.A., Bernardo, D., Blanco, G., Vázquez, E., Sánchez, J.A., 2006. Isolation and characterization of polymorphic microsatellite markers in *Pagellus bogaraveo*, and cross-species amplification in *Sparus aurata* and *Dicentrarchus labrax*. *Mol. Ecol. Notes* 6, 33–35.
- Ponce, M., Infante, C., Crespo, A., Zuasti, E., Pérez, L., Funes, V., Catanese, G., Cárdenas, S., Manchado, M., 2006. Characterization of microsatellite loci for the redbanded seabream, *Pagrus auriga* (Teleostei, Sparidae). *Mol. Ecol. Notes* 6, 527–529.
- Presa, P., Guyomard, R., 1996. Conservation of microsatellites in three species of salmonids. *J. Fish Biol.* 49, 1326–1329.
- Ramšak, A., Garioia, F., Guarniero, I., Mannini, P., Tinti, F., 2003. Novel polymorphic microsatellite markers for the common Pandora (*Pagellus erythrinus*). *Mol. Ecol. Notes* 3, 553–555.
- Renshaw, M.A., Saillant, E., Bradfield, S.C., Gold, J.R., 2006. Microsatellite multiplex panels for genetic studies of three species of marine fishes: red drum (*Sciaenops ocellatus*), red snapper (*Lutjanus campechanus*), and cobia (*Rachycentron canadum*). *Aquaculture* 253, 731–735.
- Rogers, S.M., Marchand, M.H., Bernatchez, L., 2004. Isolation, characterization and cross-salmonid amplification of 31 microsatellite loci in the lake whitefish (*Coregonus clupeaformis*, Mitchill). *Mol. Ecol. Notes* 4, 89–92.
- Roques, S., Galarza, J.A., MacPerson, E., Turner, G.F., Rico, C., 2006. Isolation and characterization of nine polymorphic microsatellite markers in the two-banded sea bream (*Diplodus vulgaris*) and cross-species amplification in the white sea bream (*Diplodus sargus*) and the saddled bream (*Oblada melanura*). *Mol. Ecol. Notes* 7, 661–663.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T., 1989. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, second ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, N.Y.
- Sánchez, J.J., Borsting, C., Hallenberg, C., Buchard, A., Hernández, A., Morling, N., 2003. Multiplex PCR and minisequencing of SNPs—a model with 35 Y chromosome SNPs. *Forensic Sci. Int.* 137, 74–84.
- Selkoe, K.A., Toonen, R.J., 2006. Microsatellites for ecologists: a practical guide to using and evaluating microsatellite markers. *Ecol. Letters* 9, 615–629.
- Senger, E., Priat, C., Hitte, C., Sarropoulou, E., Franch, R., Geisler, R., Bargelloni, L., Power, D., Galibert, F., 2006. The first radiation hybrid map of a perch-like fish: the gilthead seabream (*Sparus aurata* L.). *Genomics* 87, 793–800.
- Stockley, B.M., Rogers, A.D., Iyengar, A., Menezes, G., Santos, R., Long, A., 2000. Ten microsatellite loci isolated and developed for the blackspot seabream, *Pagellus bogaraveo* (Brunnich 1768). *Mol. Ecol.* 9, 999–1000.
- Summers, K., Amos, W., 1996. Behavioral, ecological, and molecular genetic analyses of reproductive strategies in the Amazonian dart-poison frog, *Dendrobates ventrimaculatus*. *Behav. Ecol.* 8, 260–267.
- Takagi, M., Taniguchi, N., Cook, D., Doyle, R.W., 1997. Isolation and characterization of microsatellite loci from red sea bream *Pagrus major* and detection in closely related species. *Fish. Sci.* 63, 199–204.
- Villanueva, B., Verspoor, E., Visscher, P.M., 2002. Parental assignment in fish using microsatellite genetic markers with finite numbers of parents and offspring. *Anim. Genet.* 33, 33–41.
- Wesmajervi, M.S., Westgaard, J.I., Delghandi, M., 2006. Evaluation of a novel pentaplex microsatellite marker system for paternity studies in Atlantic cod (*Gadus morhua* L.). *Aquacult. Res.* 37, 1195–1201.
- Yang, W.T., Li, J., Yue, G.H., 2006. Multiplex genotyping of novel microsatellites from silver pomfret (*Pampus argenteus*) and cross-amplification in other pomfret species. *Mol. Ecol. Notes.* 6, 1073–1075.
- Yuryev, A., Huang, J., Pohl, M., Patch, R., Watson, F., Bell, P., Donaldson, M., Phillips, M.S., Boyce-Jacino, M.T., 2002. Predicting the success of primer extension genotyping assays using statistical modeling. *Nucl. Acids Res.* 30, e131.

### *3. Navarro et al., 2009*

---

**A. Navarro et al / Aquaculture (2009)**

|   |  |
|---|--|
| <b>Date:</b>  | Dec 22, 2008                               |
| <b>To:</b>  | "Juan Manuel Afonso" jafonso@dpac.ulpgc.es |
| <b>From:</b>  | hulata@int.gov.il                          |
| <b>Subject:</b>   | Your Submission                            |
| <p>Ms. Ref. No.: AQUA-D-08-00993R2<br/>Title: <b>Estimates of heritabilities and genetic correlations for growth and carcass traits in gilthead seabream (<i>Sparus auratus</i> L.), under industrial conditions.</b><br/>Aquaculture</p> <p>Dear Juan,</p> <p>I am pleased to confirm that your paper "Estimates of heritabilities and genetic correlations for growth and carcass traits in gilthead seabream (<i>Sparus auratus</i> L.), under industrial conditions." has been accepted for publication in Aquaculture.</p> <p>Thank you for submitting your work to Aquaculture.</p> <p>Happy holidays season and new year!</p> <p>With kind regards,</p> <p>Gideon Hulata, PhD<br/>Section Editor<br/>Aquaculture</p> |  |

## **A. Navarro et al / Aquaculture (2009)**

### **Estimates of heritabilities and genetic correlations for growth and carcass traits in gilthead seabream (*Sparus auratus* L.), under industrial conditions**

Ana Navarro<sup>a</sup>, María J. Zamorano<sup>a</sup>, Silvia Hildebrandt<sup>a</sup>, Rafael Ginés<sup>a</sup>, Cristóbal Aguilera<sup>b</sup>, Juan M. Afonso<sup>a\*</sup>

<sup>a</sup>Universidad de Las Palmas de Gran Canaria (ULPGC). Instituto Universitario de Sanidad Animal y Seguridad Alimentaria (IUSA). Grupo de Investigación en Acuicultura (GIA). Trasmontaña s/n, 35413, Arucas, Las Palmas, Spain.

<sup>b</sup>IRTA. Centro de Acuicultura. Unidad de Cultivos Experimentales. Grupo de cultivo larvario y Nutrición. Ctra. Poble Nou Km 6, 43540 San Carlos de la Rápita, Tarragona, Spain.

\* Corresponding author: Tel.: +34 928 459735; Fax.: +34 928 451142; E-mail: [jafonso@dpat.ulpgc.es](mailto:jafonso@dpat.ulpgc.es)

#### **Abstract**

In this study, for the first time on gilthead seabream (*Sparus auratus* L.), genetic parameters for growth and carcass traits were estimated at 509 days (harvest size), and for growth only at another three ages (130, 165 and 330 days). A total of 867 offspring from an industrial mass spawning of 66 broodstocks were analysed. Parental assignment was inferred using the RimA multiplex PCR designed by Navarro et al. (2008) and 100% success was obtained. Seventeen dams and 11 sires contributed to the spawn and a total of 89 full-sib families (eight paternal half-sib families and 16 maternal half-sib families) were represented. The heritability estimates at harvest were  $0.34 \pm 0.06$  for body weight,  $0.33 \pm 0.07$  for fork length,  $0.13 \pm 0.04$  for condition factor,  $0.26 \pm 0.06$  for gutted body weight,  $0.15 \pm 0.04$  for fillet weight,  $0.31 \pm 0.07$  for dressing percentage, and  $0.12 \pm 0.03$  for fillet percentage. For growth traits at different ages, heritabilities ranged from 0.28 to 0.34 for weight, from 0.27 to 0.35 for length, and from 0.05 to 0.13 for condition factor. At any age, the correlation between weight and length was close to one. Correlations for lengths or weights at two consecutive ages were also high but they decreased with increasing difference in age. Negative and medium genetic correlations between fillet percentage and growth traits (weight and length) were obtained, however these correlations were positive and high for fillet weight. These data suggest that direct selection of length, which is an easily measurable trait, also improves carcass traits. However, the inclusion of fillet percentage in breeding programmes is recommended due to the negative genetic correlation with length. These results highlight the potential for the gilthead seabream industry to improve its production not only through handling but also through the exploitation of additive genetic variation.

**Keyword:** heritability, genetic correlation, growth, carcass trait, gilthead seabream, *Sparus auratus*, parentage assignment.

## 1. Introduction

Gilthead seabream (*Sparus auratus* L.) is a species with a wide geographical range in the wild (Lythageo and Lythageo, 1992; Moretti et al., 1999) whose eurytherm and euryhaline characteristics have led to the expansion and consolidation of its culture in nearly all Mediterranean and Mid-west Atlantic countries and to a growth in production at an annual rate of almost 15% in the last decade, reaching 124,640 tons in 2006 (APROMAR, 2007).

The growth and consolidation of the gilthead seabream industry have been accompanied by the stabilisation of the market prices in the last four years but with important seasonal fluctuations that have forced companies to optimise their yield and to plan their production more and more. In this sense, competitiveness among gilthead seabream companies has improved through higher farming pressure and intensity, minimising of costs and/or enhanced product value. With this aim, companies perform different courses of action related to nutrition, stock management, illness prevention or even the location of their facilities.

However, strategies that involve the development of selection schemes in gilthead seabream for traits of economic interest are scarce (Afonso et al., 1998; Montero et al., 2001; Gorshkov et al., 2002), partly due to the reproductive characteristics of the species. In commercial gilthead seabream broodstocks, effective population sizes are low due to the high fecundity rate, the high variance in family size and fewer males than females contributing in each mass-spawning (Brown et al., 2005). Nevertheless, mass-spawning is widely used among broodstocks ranging between 40 and 60 individuals in order to assure quality and offspring survival. From a genetic point of view, this industrial strategy has the advantage that common environmental sources are reduced, thus raising the precision of genetic parameter estimations (Herbinger et al., 1999). But on the other hand, it prevents knowing the genealogy of fish under culture conditions, which is absolutely necessary to estimate genetic parameters and to introduce selection programmes. For this reason studies related to genetic parameter estimations for traits of economic interest are scarce. Knibb et al. (1997) estimated realised heritability for weight at harvest size, after a single generation of mass selection. Montero et al. (2001) estimated the heritability of plasmatic cortisol measured after subjecting the fish to confinement stress. Castro et al. (2008) reported estimations of heritability for skeletal abnormalities (lordosis and lack of operculum) in fingerlings, on an experimental scale.

The introduction of breeding programmes in this kind of industrial production system needs both physical tagging and genetic identification of the exploited fish (Wesmajervi et al., 2006). In gilthead seabream, it is possible to physically identify fingerlings through Passive Integrated Transponder (PIT) tagging systems (Navarro et al., 2006). It is also possible to reconstruct parent-offspring relationships by analysing enough microsatellite markers (Batargias et al., 1999; Castro et al., 2007; Borrell et al., 2007), which can be combined in multiplex PCRs to reduce costs (Navarro et al., 2008).

Using industrial production systems and combining physical tagging and genetic identification of fish, the aim of this study was to estimate heritabilities and genetic correlations for growth and carcass traits at hatchery and harvest sizes from offspring of a commercial gilthead seabream broodstock.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Rearing conditions and analyzed traits

An egg batch obtained from 66 breeders of the Tinamenor S.A. company (San Vicente de la Barquera, Cantabria, Spain) was cultured in the industrial-like facilities of the Instituto Canario de Ciencias Marinas (ICCM, Gran Canaria, Spain). Eggs and larvae were reared in the conditions described by Roo et al. (1999).

## ***A. Navarro et al / Aquaculture (2009)***

Fingerlings were not graded in terms of deformities due to the stock's good quality (Afonso and Roo, 2007). At 130 days post-hatching ( $4.8 \pm 1.1$  g) (mean  $\pm$  standard deviation), all fish were taken to the facilities of the Playa de Vargas 2001 S.L. Company (PLV2001, Gran Canaria, Spain), except a sample of 472 individuals, which remained in the on-growing facilities of the ICCM.

The fish that remained in the ICCM were individually tagged (130 days post-hatching) in the abdominal cavity with a Passive Integrated Transponder (PIT; Trovan Daimler-Benz), following the tagging protocol described by Navarro et al. (2006), and were distributed in three 1000-l tanks where they were reared under intensive conditions to commercial size (300–500 g). Food was provided through self-feeders using commercial fish feed (Proaqua S.A., Dueñas-Palencia, Spain). Water temperature ranged from  $19.3 \pm 0.2^\circ\text{C}$  in March to  $25.0 \pm 0.3^\circ\text{C}$  in September. Values for dissolved oxygen and water flow were  $6.0 \pm 0.5$  ppm and  $21 \text{ l}\cdot\text{min}^{-1}$ , respectively. Fish density ranged from  $2.3 \pm 0.1 \text{ kg}\cdot\text{m}^{-3}$  at the beginning of the experiment to  $35.0 \pm 3.9 \text{ kg}\cdot\text{m}^{-3}$  at the end. At the ages of 130, 165, 330 days post-hatching, the body weight and fork length of all fish were measured; 130 and 165 days are approximately the sale ages for fingerlings (2–20 g). 165 days is also the age at which the industry carries out the final reorganisation of their fish baths and/or the removal of deformed fish. The age of 330 days corresponded to the reproductive season and was chosen because at this point an incipient sexual maturity exists (Zohar et al., 1978; Micale and Perdichizzi, 1990) that might negatively interfere with growth (Ginés et al., 2003).

The fish at PLV2001 were reared in a cage and fed with commercial fish feed (Proaqua S.A., Dueñas-Palencia, Spain and BioMar A/S, Brande, Denmark) at a daily specific feed rate of 5.6–1% per body weight. Fish densities ranged from  $1 \text{ kg}\cdot\text{m}^{-3}$  during the hatchery period to  $25 \text{ kg}\cdot\text{m}^{-3}$  at the end of the on-growing period, and dissolved oxygen in the water had an average value of 7 ppm.

At harvest size (509 days post-hatching), at the end of July, fish from ICCM (472 fish) and a sample of fish from PLV2001 (395 fish) were slaughtered and the following traits were recorded: body weight, fork length and gutted body weight. Fish were manually skinned and filleted without including the nape and the belly flap. Both fillets were weighed together. Derived traits were also calculated as follows: dressing percentage ( $100 \times \text{gutted body weight} \times \text{body weight}^{-1}$ ), fillet percentage ( $100 \times \text{fillet weight} \times \text{body weight}^{-1}$ ) and condition factor ( $100 \times \text{body weight} \times \text{fork length}^{-3}$ ).

### *2.2. Genotyping and parental assignment*

All 867 offspring and 66 breeders were genetically characterised using the nine microsatellite markers RimA multiplex designed by Navarro et al. (2008). A fragment of the caudal fin was preserved in 1 ml of absolute ethanol until DNA extractions. DNA was extracted following the phenol-chloroform method (Sambrook et al., 1989). DNA was stored at  $4^\circ\text{C}$  in  $50 \mu\text{l}$  of TE 1x solution. Amplification, running and reading conditions for the microsatellite markers are described in Navarro et al. (2008). Familial assignments for gilthead seabream broodstock of unknown gender were determined using the exclusion method with non-commercial software provided by Dr. J. Fernández (INIA-Madrid, Spain).

### *2.3. Data analysis*

All data were tested for normality and homogeneity of variances, and then analysed using a General Linear Model, in order to detect the effects of facility and tank, using SPSS (v. 15.0) (SPSS, Chicago, IL, USA). Then, variance components for body weight, fork length, condition factor, gutted body weight, fillet weight, dressing percentage and fillet percentage were estimated by Restricted Maximum Likelihood (REML) using the following linear model:



## **A. Navarro et al / Aquaculture (2009)**

$$y = X\beta + Zu + e$$

where  $y$  was the data recorded for the studied traits,  $\beta$  the fixed effects (facility and tank) and  $u$  the random animal genetic effect. The model was resolved with the software package VCE (v. 5.1.2) (Kovač et al., 2002). The magnitude of estimated heritability was established, following the classification of Cardellino and Rovira (1987), as low (0.05–0.15), medium (0.20–0.40), high (0.45–0.60), and very high (> 0.65). Correlations were classed as low (0–0.40), medium (0.45–0.55) and high (0.60–1), regardless of the sign.

Genotype-environment interactions were estimated through genetic correlations between a trait in the PLV2001 facility and the same trait in the ICCM facility, using VCE (v. 5.1.2) (Kovač et al., 2002).

### **3. Results**

#### *3.1. Genotyping and parental assignment*

One hundred percent success in familial assignment (each offspring was assigned to a single parent pair) was obtained with RimA, using the exclusion method with one tolerated error. After revising genotypes, all errors were identified as null alleles. Within broodstocks, only marker *PbMS2* showed null alleles with a frequency of 5.36%. In offspring, as expected under the Hardy-Weinberg equilibrium, this frequency was very similar, at 5.07%, indicating that there was no mutation rate activity during segregation. Only 28 fish, 17 females and 11 males, out of the 66 breeders, contributed to the spawn. A total of 89 full-sib families (eight paternal half-sib families and 16 maternal half-sib families) were represented in the 867 offspring sample, with a mean of 9.7 descendents per family (ranging between 1 and 53).

#### *3.2. Growth and carcass traits, and GxE interactions*

At 130 days both the individuals sent to the company and those which remained in the ICCM showed the same values for body weight, fork length and condition factor. Table 1 depicts these growth variables at 130, 165 and 330 days for the ICCM fish. A tank effect was not detected at 165 days, while it was significant at 330 days ( $P < 0.005$ ), due to differences in the oxygen level and/or water flow, which disappeared once these problems were fixed. Table 2 shows the results for the growth and carcass traits for fish in both facilities at harvest size (509 days). At this age, no significant effects were found for tanks, but there was an effect for the facility. All values, except dressing percentage, were higher for those fish cultured in PLV2001. At harvest size, all fish were immature. The coefficients of variation for growth traits can be calculated from data of Tables 1 and 2. For weight they were at least three times larger than those for length and twice as large as those for condition factor, regardless of age (19.3, 5.9, 7.9 mean for weight, length and condition factor, respectively).

Genetic correlations between facilities (PLV2001 and ICCM) for each trait were high and ranged from 0.7–0.99, as reported in Table 2.

#### *3.3. Heritabilities and correlations*

Genetic and phenotypic correlations among growth traits, and their heritabilities are shown in Table 3. For heritabilities, estimations ranged from 0.28 to 0.34 for weight, from 0.27 to 0.35 for length, from 0.05 to 0.13 for condition factor, and from 0.12 to 0.31 for carcass traits. As expected, correlations between weight and length were close to one at each age, from 0.96 to 0.99 for genetic correlations and between 0.87 and 0.93 for phenotypic correlations. Correlations for lengths or weights at two consecutive ages were also high but they decreased with increasing differences in age. On average, the phenotypic correlations were higher than

## ***A. Navarro et al / Aquaculture (2009)***

the genetic correlations. Regarding condition factor phenotypic and genetic correlations also decreased with age, however the phenotypic correlations were lower than the genetic correlations. Estimations for carcass traits, including growth traits only at harvest size, are shown in Table 4. The correlations of dressing and fillet percentage traits with growth traits were mainly negative (except fillet percentage vs condition factor), with low values for phenotypic correlations and medium values for genetic correlations. For dressing percentage genetic correlations with other traits were poorly consistent due to high standard errors. Nevertheless, genetic and phenotypic correlations of gutted body weight and fillet weight with growth traits were positive and high.

### **4. Discussion**

#### ***4.1. Genotyping and parental assignment***

The correct inference of genealogy in genetic programmes is necessary for the estimation of genetic parameters and breeding values (Dodds et al., 2005). It is especially important in sparid species with mass-spawning, like gilthead seabream, where the contribution of breeders is unknown and the genealogy can only be inferred by analysis of microsatellite marker sets. The resolution power of microsatellite sets depends on the number of markers and their polymorphisms, genotyping errors, the presence of null alleles, the number of breeders contributing to spawning or the increase in homozygosity. With all these variables the success of parental assignment through the use of a multiplex PCR reaction of microsatellites for commercial species in order to obtain genetic parameters has ranged from 91% to 100% (Fishback et al., 2002; Saillant et al., 2006, 2007; Dupont-Nivet et al., 2008). In gilthead seabream, Castro et al. (2008) obtained a 100% success rate using 11 microsatellite markers through single reactions. This result was also obtained in the present study using a simple multiplex reaction. The use of multiplex PCRs minimises errors and genotyping costs. Navarro et al. (2008) reported a cost at least 6.3 times lower than for single reactions, including the personnel, consumable and running costs, for a multiplex reaction of 10 microsatellite markers. Moreover, the efficiency and cost reduction of multiplex reactions makes them suitable on an industrial scale, as demonstrated in the present study where all the descendents of an industrial broodstock of unknown gender were correctly assigned (each offspring was assigned to a single parent pair), despite the presence of null alleles in the population.

#### ***4.2. Growth and carcass traits, and GxE interactions***

Gilthead seabream is a peculiar cultured species with several traits that the companies are interested in exploiting. Food conversion is the most important trait since food represents a very important cost of production, amounting to 40% in gilthead seabream (Jover, 2007). As it is difficult to measure in industrial conditions and it would seem to be improved by increasing weight or length at different ages. The morphology of the fish, which is reflected in the condition factor, is also an important trait influencing the price of species that are sold as whole fish. However, in this species the importance of carcass traits is growing over the marketing of whole fish and is opening new possibilities for fish commercialisation. Recently, a Spanish market study reported that the consumption of filleted fish rose from 3.6% in 1993 to 6.3% in 2002 and concluded that filleting would increase demand to over 6,100 t/year (Luna, 2006).

Gilthead seabream is mainly commercialised at 350–500 g. This weight is achieved at different ages, depending on the isotherms during growth. In the Canary Islands, Ginés et al. (2004) studied the growth of gilthead seabream from 25 g to harvest size for 345 days and obtained 400 g of weight and no tank effect during the whole on-growing process. Those data were in keeping with the results of this study, where a significant effect of the facilities on growth was detected. The lower values obtained for the ICCM compared to those for PLV2001 were probably due to differences in density and dissolved oxygen saturation levels

## **A. Navarro et al / Aquaculture (2009)**

during the last on-growing period. Regarding dressing percentage, the results obtained by Ginés (1997) and Oliva (2008) at harvest size (92.4% and 90.9%, respectively) are consistent with the present study. Concerning fillet percentage, Luna (2006) showed the effect of the filleting system used. At slaughter size, excluding nape and belly flap weights, Oliva (2008) and Luna (2006) reported values of 41% and 49%, respectively, which are consistent with this study.

Estimations of GxE interaction for important economic traits define the phenotypic values of populations and need to consider specific genetic programmes in each environment. In the present study, all genetic correlations for growth traits between facilities were high (mean of 0.8), while for carcass traits they were close to 1 (mean of 0.93), indicating a low or absent genetic-environment interaction. This result is expected when all descendents come from the same genetic background or broodstock and they are reared in similar environmental conditions (Dupont-Nivet et al., 2008), allowing the same response of selection in different environments (Ponzoni et al., 2005).

### *4.3. Heritabilities and correlations*

In species such as Atlantic salmon (*Salmo salar*), coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*), rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*), common (*Cyprinus carpio*) and rohu (*Labeo rohita*) carp, Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) and channel catfish (*Ictalurus punctatus*), genetic improvement programmes have been successfully implemented with important genetic gains achieved for growth (Gjedrem, 1997; Gjedrem and Thodesen, 2005). To establish similar programmes in gilthead seabream it is essential to know the genetic variation for traits of commercial interest. For growth traits in gilthead seabream, Knibb et al. (1997) estimated realised heritabilities for weight at harvest size under common rearing conditions, after a single generation of divergent selection against a control population (up and down selection), which ranged from  $0.29 \pm 0.04$  (down-selection) to  $0.51 \pm 0.13$  (up-selection). In the present study, weight and length, independently of age, showed medium–high mean heritabilities, at  $0.31 \pm 0.07$  and  $0.32 \pm 0.07$ , respectively. Heritability for weight at slaughter was  $0.34 \pm 0.06$ , which is in keeping with results obtained by Knibb et al. (1997). The estimates in the present study were obtained in offspring from a single broodstock where the variance in parental contribution (higher male than female) and percentage of parents contributing to the spawn are in accordance with other industrial mass spawning data (Batargias et al., 1997; Brown et al., 2005). Given that the industry normally supports its production with several broodstocks, the estimations of this study suggest that the additive genetic component of gilthead seabream may be higher, even though breeders within the industry are usually related.

Heritabilities for condition factor have been described as medium–high values in juveniles of red drum (*Sciaenops ocellatus* L.) (0.28–0.47) and common carp ( $0.37 \pm 0.08$ ), by Saillant et al. (2007) and Vandeputte et al. (2004), respectively. While Dupont-Nivet et al. (2008) found values for sea bass at slaughter of  $0.19 \pm 0.04$ , which are lower than their estimations of heritabilities for weight and length ( $0.62 \pm 0.06$  and  $0.54 \pm 0.06$ , respectively). These last data are in accordance with the present study, where the lower heritabilities of condition factor in comparison with other species can be explained because gilthead seabream presents, proportionally, a greater growth in height than in length (Ginés, 1997) and because at the latitude of the Canary Islands, fish are immature during the growing period and at commercial size (Ginés et al., 2004), without affecting fish morphology. On the other hand, the decrease in the coefficient of variation for weight with age, which can be inferred from Tables 1 and 2, was proportionally higher in weight versus length and condition factor, explaining the increasing heritability from fingerling to slaughtering size.

The additive genetic variation for carcass traits that has been described in different species such as salmonids, cyprinids and black bream (*Acanthopagrus butcheri*) has a very wide range (Gjerde and Schaeffer, 1989; Kause et al., 2002; Neira et al., 2004; Doupé and Lymbery, 2005; Rutten et al., 2005; Kause et al., 2007; Kocour et al., 2007; Powell et al., 2008). For gutted body weight, medium and high heritabilities

## ***A. Navarro et al / Aquaculture (2009)***

(0.21–0.51) have been reported, all of them in the same range as those obtained in the present study. The variation is even higher for dressing percentage. Powell et al. (2008), for example, obtained values that did not differ from zero ( $0.02 \pm 0.03$ ) but that found by Kause et al. (2002) was high, at  $0.45 \pm 0.07$ , and more in accordance with estimations in the present study. There is great variation in additive genetic estimates in different species for fillet weight and fillet percentage, but in general estimated heritabilities are lower for fillet percentage (0.03–0.33) than for fillet weight (0.21–0.52). This study also found lower heritabilities for fillet percentage than for fillet weight, and generally lower values than those described for other species, but they were similar to estimations reported by Neira et al. (2004) ( $0.11 \pm 0.05$  and  $18 \pm 0.07$ , respectively).

Weight and length are traits that are genetically and phenotypically correlated (Elvingson and Johansson, 1993; Winkelman and Peterson, 1994; Vandeputte et al., 2008), in concordance with the results of the present study at each age. At the same time, their similar heritabilities reveal that any of these traits would be useful for selection although length would be more suitable since it is easier to measure in the field (Vandeputte et al., 2008), and has a lower coefficient of variation therefore being more repeatable than weight. In this sense, Friars et al. (1995) have demonstrated the usefulness of fork length instead of weight in genetic selection indexes for Atlantic salmon, both at commercial and sexual maturity size. The estimation of genetic correlations among ages is interesting since it allows a decision to be made about preselection at early sizes depending on their magnitude. In general, genetic correlations between weights or lengths for distant ages are low (0.3–0.5) for different species (Myers et al., 2001; Kolstad et al., 2006; Vandeputte et al., 2008), which is in keeping with the correlations of the present study at 130 or 165 days with slaughter age. These values suggest that selection at early developmental stages would not be appropriate, especially given that they were even lower than those described by other authors. Nevertheless, these estimations would be useful for the construction of selection indexes. Using genetic correlations similar to those found in this study for fingerling and slaughter states, Friars et al. (1995) showed the importance of using familial information at different ages in the selection rates at commercial and sexual maturity sizes. On the contrary, genetic correlations between ages near slaughter are high (0.6–0.8) (Elvingson and Johansson, 1993; Winkelman and Peterson, 1994; Saillant et al., 2006), which are in agreement with the correlations of this study at 330 days with harvest size. Genetic correlations for condition factor, although generally high, were also higher between consecutive ages than between distant ages, as in other species (Elvingson and Johansson, 1993; Fishback et al., 2002; Saillant et al., 2007).

Condition factor is a trait that is genetically correlated with weight and length. In different species, negative and positive genetic correlations have been found between these traits with condition factor for fingerlings and high size respectively (Elvingson and Johansson, 1993; Fishback et al., 2002; Vandeputte et al., 2004). All these results are in keeping with correlations presented in this study between both traits and condition factor which were negative at small sizes and positive for juveniles and adults. Furthermore, direct selection for harvest length in gilthead seabream together with the low genetic correlation between length and condition factor would have little effect on fish morphology. This is an advantage since an undesirable body conformation would decrease marketability (Elvingson and Johansson, 1993).

Concerning carcass traits, knowledge about their genetic correlations with growth traits is very important in order to make decisions in genetic selection processes. In the case of correlations of gutted body weight and fillet weight with weight and length, these are consistent among species, being very high and positive in gilthead seabream in this study and for other species (Gjerde and Gjedrem, 1984; Kause et al., 2002; Neira et al., 2004; Doupé and Lymbery, 2005; Rutten et al., 2005; Kause et al., 2007; Kocour et al., 2007; Powell et al., 2008). The genetic correlations of dressing percentage and fillet percentage with weight and length are not that consistent among species, ranging from high and positive (Doupé and Lymbery, 2005; Rutten et al., 2005; Kocour et al., 2007), to almost zero (Kause et al., 2002, 2007), while Neira et al., (2004) found positive values for fillet percentage but negative values for dressing percentage. In this study correlations were also close to zero for dressing percentage and negative for fillet percentage. These results show that in gilthead

## **A. Navarro et al / Aquaculture (2009)**

seabream, gutted body weight and fillet weight increase as fish weight and length increase, both from the genetic and the phenotypic point of view, as denoted by the very high correlations between these traits. On the contrary dressing percentage and fillet percentage do not depend on weight and length as shown by phenotypic correlations, although fillet percentage does from the genetic point of view where correlations are negative. These latter data suggest that fillet percentage should be controlled in fish with improved growth, and its inclusion in breeding programmes is recommended. In any case, it seems appropriate to improve carcass traits in gilthead seabream through direct selection of length, since the evaluation of carcass traits is laborious, requires technical skills and the slaughter of the fish (Kause et al., 2007), whereas length can easily be measured in the field and allows the evaluation of a higher number of fish per time unit, thus increasing the intensity of selection. Furthermore, the magnitude and consistency of correlations of gutted body weight and fillet weight with length, predict a higher correlated response for those traits than a direct response.

### **5. Conclusion**

This study shows, for the first time for gilthead seabream, that it is possible to estimate genetic parameters for growth and carcass traits, under industrial conditions. This can be achieved by combining the use of physical tagging (PIT) and genetic identification (multiplex microsatellite markers) of the offspring from mass spawning of broodstocks without interfering with the production system. This highlights the potential of the gilthead seabream industry to improve its production not only through handling but also through the exploitation of additive genetic variation by crossing breeders with genetic criteria (inbreeding and breeding values).

### **Acknowledgments**

The authors wish to thank everyone who participated in the fish assessment, especially Sara and Samuel Afonso. We are also grateful to Tinamenor S.L Company for the fins of breeders, to Playa de Vargas 2001 S.L. Company and the ICCM staff for their help during fish on-growing, and to Dr. Jesús Fernández for providing the non-commercial software for parental assignment. This study was supported by projects of the Canary Government (PI2000/63, PI2002/212) and a grant from the University of Las Palmas de Gran Canaria for Ana Navarro. We also acknowledge the comments of referees, which have improved much this manuscript.

### **References**

- Afonso, J.M., Montero, D., Robaina, L., Fernandez, H., Izquierdo, M.S., Gines, R., 1998. Selection scheme for stress tolerance in gilthead seabream. *Cah. Options Méditerr.* 34, 235-245.
- Afonso, J.M., Roo, F.J., 2007. Anomalías morfológicas en peces cultivados: heredabilidad y selección. In Martínez, P., Figueras, A. (Eds), *Genética y genómica en acuicultura*. C.S.I.C., Madrid, pp. 213-240.
- APROMAR, 2007. *La acuicultura marina de peces en España*.
- Batargias, C., Dermizakis, E., Magoulas, A., Zouros, E., 1999. Characterization of six polymorphic microsatellite markers in gilthead seabream, *Sparus aurata* (Linnaeus 1758). *Mol Ecol.* 8, 897-898.
- Batargias, C., Kotoulas, G., Magoulas, A., Zouros, E., 1997. Retrospective parentage identification in a mass spawning of gilthead seabream, by means of microsatellite DNA. Preliminary results of genetic selection. *Proceedings of the fifth Panhellenic Congress of Oceanography and Fisheries, 15-18 April 1997, Kavala, Greece, 203-207.*

## **A. Navarro et al / Aquaculture (2009)**

- Borrell, Y.J., Carleos, C.E., Asturiano, J.F., Bernardo, D., Vázquez, E., Corral, N., Sánchez, J.A., Blanco G., 2007. Use of microsatellites and a combinatorial optimization approach in the acquisition of gilthead seabream (*Sparus aurata* L.) broodstocks for hatcheries. *Aquaculture* 269, 200-210.
- Brown, R.C., Woolliams, J.A., McAndrew, B.J., 2005. Factors influencing effective population size in commercial populations of gilthead seabream, *Sparus aurata*. *Aquaculture* 247, 219-225.
- Cardellino, R., Rovira, J., 1987. Mejoramiento genético animal. Hemisferio Sur, Buenos Aires, 253 pp.
- Castro J., Pino, A., Hermida, M., Bouza, C., Chavarrias, D., Merino, P., Sánchez, L., Martínez P., 2007. A microsatellite marker tool for parentage assessment in gilthead seabream (*Sparus aurata*). In: M., Vandeputte, Chatain B., Hulata G. (eds.), *Genetics in Aquaculture: Proceedings of the Ninth International Symposium*, 26-30 June 2006, Montpellier, France. *Aquaculture*, 272, Supplement 1, 210-216.
- Castro, J., Pino-Querido, A., Hermida, M., Chavarrias, D., Romero, R., García-Cortés, L.A., Toro, M.A., Martínez, P., 2008. Heritability of skeleton abnormalities (lordosis, lack of operculum) in gilthead seabream (*Sparus aurata*) supported by microsatellite family data. *Aquaculture* 279, 18-22.
- Dodds, K.G., Tate, M.L., Sise, J.A., 2005. Genetic evaluation using parentage information from genetic markers. *J. Anim. Sci.* 83, 2271-2279.
- Doupé, R.G., Lymbery, A.J., 2005. Genetic covariation in production traits of sub-adult black bream *Acanthopagrus butcheri* after grow-out. *Aquacult. Res.* 36, 1128-1132.
- Dupont-Nivet, M., Vandeputte, M., Vergnet, A., Merdy, O., Haffray, P., Chavanne, H., Chatain, B., 2008. Heritabilities and GxE interactions for growth in the european sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) using a marker-based pedigree. *Aquaculture* 275, 81-87.
- Elvingson, P., Johansson, K., 1993. Genetic and environmental components of variation in body traits of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) in relation to age. *Aquaculture* 118, 191-204.
- Friars, G.W., Bailey J.K., O'Flynn F.M., 1995. Applications of selection for multiple traits in cage-reared Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Aquaculture* 137, 213-217.
- Fishback, A.G., Danzmann, R.G., Ferguson, M.M., Gibson, J.P., 2002. Estimates of genetic parameters and genotype by environment interactions for growth traits of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) as inferred using molecular pedigrees. *Aquaculture* 206, 137-150.
- Ginés, R., 1997. Posibilidades de manipulación del fotoperíodo durante el engorde intensivo de dorada (*Sparus aurata*). Ph.D., Universidad de Las Palmas de Gran Canaria
- Ginés, R., Afonso, J.M., Argüello, A., Zamorano, M.J., López, J.L., 2003. Growth in adult gilthead seabream (*Sparus aurata* L.) as a result of interference in sexual maturation by different photoperiod regimes. *Aquacult. Res.*, 34, 73-83.
- Ginés, R., Afonso, J.M., Argüello, A., Zamorano, M.J., López, J.L., 2004. The effects of long-day photoperiod on growth, body composition and skin colour in immature gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.). *Aquacult. Res.* 35, 1207-1212.
- Gjedrem, T., 1997. Selective breeding to improve aquaculture production. *World Aquaculture* 33-45.
- Gjedrem, T., Thodesen, J., 2005. Selection. In: Gjedrem (Ed.), *Selection and breeding programs in aquaculture*. Springer, Berlin, pp. 89-111.
- Gjerde, B., Gjedrem, T., 1984. Estimates of phenotypic and genetic parameters for carcass traits in Atlantic salmon and rainbow trout. *Aquaculture* 36, 97-110.
- Gjerde, B., Schaeffer, L.R., 1989. Body traits in rainbow trout II. estimates of heritabilities and of phenotypic and genetic correlations. *Aquaculture* 80, 25-44.
- Gorshkov, S., Gordin, H., Gorshkova, G., Knibb, W., 2002. Genetic improvement of sea bass and seabream: practical applications. *Isr. J. Aquacult.-Bamidgeh* 54, 53.

## **A. Navarro et al / Aquaculture (2009)**

- Herbinger, C.M., O'Reilly, P.T., Doyle, R.W., Wright, J.M., O'Flynn, F., 1999. Early growth performance of Atlantic salmon full-sib families reared in single family tanks versus in mixed family tanks. *Aquaculture* 173, 105-116.
- Jover, M., 2007. Alternativas de futuro para la producción de la dorada (*Sparus aurata*). In: A., Cerviño-Eiroa, Guerra-Díaz A., Pérez-Acosta C. (eds.), *Cultivando el futuro: Proceedings of the XI Congreso Nacional de Acuicultura*, 24-28 September 2007, Vigo, Spain, 1337-1342.
- Kause, A., Ritola, O., Paananen, T., 2002. Coupling body weight and its composition: a quantitative genetic analysis in rainbow trout. *Aquaculture* 211, 65-79.
- Kause, A., Paananen, T., Ritola, O., Koskinen, H., 2007. Direct and indirect selection of visceral lipid weight, fillet weight, and fillet percentage in a rainbow trout breeding program. *J. Anim. Sci.* 85, 3218-3227.
- Knibb, W., Gorshkova, G., Gorshkov, S., 1997. Selection for growth in the gilthead seabream, *Sparus aurata* L. *Isr. J. Aquacult.-Bamidgeh* 49, 57-66.
- Kocour, M., Mauger, S., Rodina, M., Gela, D., Linhart, O., Flajshans, M., Vandeputte, M., 2007. Heritability estimates for growth and dress out traits in common carp (*Cyprinus carpio* L.) using a molecular pedigree. *Aquaculture* 270, 43-50.
- Kolstad, K., Thorland, I., Refstie, T., Gjerde, B., 2006. Genetic variation and genotype by location interaction in body weight, spinal deformity and sexual maturity in atlantic cod (*Gadus morhua*) reared at different locations off Norway. *Aquaculture* 259, 66-73.
- Kovač M., Groeneveld E., García-Cortés L.A., 2002. VCE-5: A package for the optimization of dispersion parameters. *Proceedings of the 7<sup>th</sup> World Congress on Genetics Applied to Livestock Production*, 20-23 August 2002, Montpellier, France.
- Luna, L., 2006. La demanda de filete de dorada en el mercado español en el mercado de la dorada y la lubina en la Unión Europea en el periodo 2003-2006. Informe de la Secretaría General de Pesca Marítima del Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación del Gobierno de España.
- Lythageo, J.N., Lythageo, G., 1992. Fishes of the sea, The north Atlantic and Mediterranean. pp 113-114.
- Micale, V., Perdichizzi, F., 1990. Gonadal responsiveness to photoperiod extension in captivity-born *Sparus aurata* (L.) during the male phase. *Boll. Zool.* 57, 21-26.
- Montero, D., Robaina, L., Tort, L., Afonso, J.M., Fernández-Palacios, H.E., Izquierdo, M.S., 2001. Selective breeding for stress tolerance in gilthead seabream *Sparus aurata*. *Proceedings of the World AQUACULTURE 2001*. 21-25 January 2001, Orlando, USA.
- Moretti, A., Pedini, M.F.C., Citolin, G., Guidastrì, R., 1999. Manual on hatchery production of Seabass and Gilthead seabream. Vol 1. Food and Agriculture Organization of the United Nations Rome.
- Myers, J.M., Hershberger, W.K., Saxton, A.M., Iwamoto, R.N., 2001. Estimates of genetic and phenotypic parameters for length and weight of marine net-pen reared coho salmon (*Oncorhynchus kisutch* Walbaum). *Aquacult. Res.* 32, 277-285.
- Navarro, A., Badilla, R., Zamorano, M.J., Pasamontes, V., Hildebrandt, S., Sánchez, J.J., Afonso, J.M., 2008. Development of two new microsatellite multiplex PCRs for three sparid species: Gilthead seabream (*Sparus auratus* L.), red porgy (*Pagrus pagrus* L.) and redbanded seabream (*P. auriga*, Valenciennes, 1843) and their application to paternity studies. *Aquaculture*, doi: 10.1016/j.aquaculture.2008.07.005
- Navarro, A., Oliva, V., Zamorano, M.J., Ginés, R., Izquierdo, M.S., Astorga, N., Afonso, J.M., 2006. Evaluation of PIT system as a method to tag fingerlings of gilthead seabream (*Sparus auratus* L.): Effects on growth, mortality and tag loss. *Aquaculture* 257, 309-315.
- Neira, R., Lhorente, J.P., Araneda, C., Díaz, N., Bustos, E., Alert, A., 2004. Studies on carcass quality traits in two populations of Coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*) phenotypic and genetic parameters. *Aquaculture* 241, 117-131.
- Oliva, V., 2008. Análisis de variabilidad genética mediante marcadores microsatélites y de la expresión del gen Delta 6 desaturasa, en poblaciones de dorada (*Sparus aurata*). Ph.D., Universidad de Las Palmas de Gran Canaria.

## **A. Navarro et al / Aquaculture (2009)**

- Ponzoni, R., Hamzah, A., Tan, S., Kamaruzzaman, N., 2005. Genetic parameters and response to selection for live weight in the GIFT strain of Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Aquaculture* 247, 203-210.
- Powell, J., White, I., Guy, D., Brotherstone, S., 2008. Genetic parameters of production traits in Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Aquaculture* 274, 225-231.
- Roo, F.J., Socorro, J., Izquierdo, M.S., Caballero, M.J., Hernandez-Cruz, C.M., Fernandez, A., Fernandez-Palacios, H., 1999. Development of red porgy *Pagrus pagrus* visual system in relation with changes in the digestive tract and larval feeding habits. *Aquaculture* 179, 499-511
- Rutten, M.J.M., Bovenhuis, H., Komena, H., 2005. Genetic parameters for fillet traits and body measurements in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus* L.). *Aquaculture* 246, 125-132.
- Saillant, E., Dupont-Nivet, M., Haffray, P., Chatain, B., 2006. Estimates of heritability and genotype-environment interactions for body weight in sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) raised under communal rearing conditions. *Aquaculture* 254, 139-147.
- Saillant, E., Ma, L., Wang, X., Gatlin, D.M., Gold, J.R., 2007. Heritability of juvenile growth traits in red drum (*Sciaenops ocellatus* L.). *Aquacult. Res.* 38, 781-788.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T., 1989. *Molecular Cloning. A laboratory manual*. 2<sup>nd</sup> edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, N.Y.
- Vandeputte, M., Kocour, M., Mauger, S., Dupont-Nivet, M., De Guerry, D., Rodina, M., Gela, D., Vallod, D., Chevassus, B., Linhart, O., 2004. Heritability estimates for growth-related traits using microsatellite parentage assignment in juvenile common carp (*Cyprinus carpio* L.). *Aquaculture* 235, 223-236.
- Vandeputte, M., Kocour, M., Mauger, S., Rodina, M., Launay, A., Gela, D., Dupont-Nivet, M., Hulak, M., Linhart, O., 2008. Genetic variation for growth at one and two summers of age in the common carp (*Cyprinus carpio* L.): Heritability estimates and response to selection. *Aquaculture* 277, 7-13.
- Wesmajervi, M.S., Westgaard, J.I., Delghandi, M., 2006. Evaluation of a novel pentaplex microsatellite marker system for paternity studies in Atlantic cod (*Gadus morhua* L.). *Aquacult. Res.* 37, 1195-1201.
- Winkelman, A.M., Peterson, R.G., 1994. Genetic parameters (heritabilities, dominance ratios and genetic correlations) for body weight and length of chinook salmon after 9 and 22 months of saltwater rearing. *Aquaculture* 125, 31-36.
- Zohar, Y., Abraham, M., Gordin, Y.H., 1978. The gonadal cycle of the captivity-reared hermaphroditic teleost *Sparus aurata* (L.) during the first two years of life. *Ann. Biol. anim. Bioch. Biophys.* 18, 877-882.



***A. Navarro et al / Aquaculture (2009)***

Table 1. Body weight, fork length and condition factor (mean±standard deviation) at different ages for gilthead seabream.

| Age<br>(days post-hatching) | Body weight (g) | Fork length (cm) | Condition factor (g·cm <sup>-3</sup> ) |
|-----------------------------|-----------------|------------------|--|
| 130                         | 4.8±1.1         | 6.6±0.5          | 1.6±0.1                                |
| 165                         | 20.7±4.3        | 10.4±0.9         | 1.8±0.1                                |
| 330                         | 188.1±31.0      | 20.5±1.0         | 2.2±0.2                                |

Condition factor =  $100 \times \text{body weight} \times \text{fork length}^{-3}$ .

**A. Navarro et al / Aquaculture (2009)**

Table 2. Body weight, fork length, condition factor and carcass traits (mean±standard deviation) for gilthead seabream at harvest (509 days of age) at each facility and genetic correlation between facilities for each trait. (ICCM: Instituto Canario de Ciencias Marinas, PLV2001: Playa de Vargas 2001 S.L.).

| Trait                                  | ICCM       | PLV2001    | Genetic correlations |
|--|------------|------------|----------------------|
| Body weight (g)                        | 365.4±62.4 | 485.6±80.3 | 0.70±0.10            |
| Fork length (cm)                       | 25.4±1.3   | 27.7±1.6   | 0.70±0.12            |
| Condition factor (g·cm <sup>-3</sup> ) | 2.2±0.2    | 2.3±0.1    | 0.99±0.13            |
| Gutted body weight (g)                 | 329.3±49.2 | 438.8±72.9 | 0.90±0.16            |
| Fillet weight (g)                      | 124.6±22.1 | 172.8±29.1 | 0.94±0.19            |
| Dressing percentage (%)                | 93.0±1.4   | 90.4±1.5   | 0.90±0.18            |
| Fillet percentage (%)                  | 35.1±3.1   | 35.7±2.6   | 0.99±0.05            |

Condition factor =  $100 \times \text{body weight} \times \text{fork length}^{-3}$ ; Dressing percentage =  $100 \times \text{gutted body weight} \times \text{body weight}^{-1}$ ; Fillet percentage =  $100 \times \text{fillet weight} \times \text{body weight}^{-1}$ .

Table 3. Phenotypic correlations (above the diagonal) and genetic correlations (in italics below the diagonal, with  $\pm$  standard error) between body weight, fork length and condition factor (CF) for gilthead seabream at different ages. Heritabilities in bold at the diagonal (with  $\pm$  standard error).

|                       | Weight <sub>130</sub> | Length <sub>130</sub> | CF <sub>130</sub> | Weight <sub>165</sub> | Length <sub>165</sub> | CF <sub>165</sub> | Weight <sub>330</sub> | Length <sub>330</sub> | CF <sub>330</sub> | Weight <sub>509</sub> | Length <sub>509</sub> | CF <sub>509</sub> |
|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-------------------|-----------------------|-----------------------|-------------------|-----------------------|-----------------------|-------------------|-----------------------|-----------------------|-------------------|
| CF <sub>509</sub>     | 0.12                  | 0.02                  | 0.25              | 0.15                  | 0.02                  | 0.35              | 0.29                  | 0.04                  | 0.53              | 0.31                  | -0.09                 | 0.13 $\pm$ 0.04   |
| Length <sub>509</sub> | 0.35                  | 0.33                  | 0.00              | 0.41                  | 0.40                  | 0.12              | 0.76                  | 0.80                  | 0.20              | 0.91                  | 0.33 $\pm$ 0.07       | 0.07 $\pm$ 0.19   |
| Weight <sub>509</sub> | 0.39                  | 0.35                  | 0.12              | 0.46                  | 0.37                  | 0.28              | 0.83                  | 0.73                  | 0.40              | 0.34 $\pm$ 0.06       | 0.97 $\pm$ 0.01       | 0.37 $\pm$ 0.16   |
| CF <sub>330</sub>     | 0.26                  | 0.11                  | 0.40              | 0.31                  | 0.24                  | 0.38              | 0.50                  | 0.08                  | 0.09 $\pm$ 0.05   | 0.65 $\pm$ 0.18       | 0.25 $\pm$ 0.10       | 0.98 $\pm$ 0.01   |
| Length <sub>330</sub> | 0.46                  | 0.49                  | 0.05              | 0.58                  | 0.59                  | 0.06              | 0.87                  | 0.27 $\pm$ 0.07       | 0.58 $\pm$ 0.28   | 0.93 $\pm$ 0.04       | 0.93 $\pm$ 0.05       | 0.45 $\pm$ 0.17   |
| Weight <sub>330</sub> | 0.55                  | 0.46                  | 0.19              | 0.66                  | 0.60                  | 0.24              | 0.31 $\pm$ 0.07       | 0.96 $\pm$ 0.02       | 0.72 $\pm$ 0.18   | 0.93 $\pm$ 0.04       | 0.85 $\pm$ 0.07       | 0.67 $\pm$ 0.12   |
| CF <sub>165</sub>     | 0.20                  | 0.14                  | 0.20              | 0.36                  | 0.08                  | 0.05 $\pm$ 0.04   | -0.13 $\pm$ 0.35      | -0.44 $\pm$ 0.27      | 0.93 $\pm$ 0.09   | 0.02 $\pm$ 0.10       | -0.04 $\pm$ 0.38      | 0.91 $\pm$ 0.55   |
| Length <sub>165</sub> | 0.83                  | 0.83                  | 0.14              | 0.93                  | 0.35 $\pm$ 0.08       | -0.24 $\pm$ 0.26  | 0.44 $\pm$ 0.15       | 0.52 $\pm$ 0.11       | 0.19 $\pm$ 0.21   | 0.71 $\pm$ 0.12       | 0.07 $\pm$ 0.19       | 0.13 $\pm$ 0.20   |
| Weight <sub>165</sub> | 0.87                  | 0.83                  | 0.23              | 0.32 $\pm$ 0.08       | 0.98 $\pm$ 0.01       | -0.11 $\pm$ 0.38  | 0.52 $\pm$ 0.13       | 0.47 $\pm$ 0.15       | 0.35 $\pm$ 0.22   | 0.23 $\pm$ 0.09       | 0.18 $\pm$ 0.18       | 0.28 $\pm$ 0.18   |
| CF <sub>130</sub>     | 0.31                  | 0.01                  | 0.05 $\pm$ 0.04   | 0.20 $\pm$ 0.16       | -0.24 $\pm$ 0.67      | 0.88 $\pm$ 0.14   | -0.29 $\pm$ 0.33      | -0.38 $\pm$ 0.33      | 0.64 $\pm$ 0.31   | -0.48 $\pm$ 0.18      | -0.69 $\pm$ 0.23      | 0.82 $\pm$ 0.32   |
| Length <sub>130</sub> | 0.92                  | 0.31 $\pm$ 0.07       | -0.23 $\pm$ 0.20  | 0.87 $\pm$ 0.05       | 0.95 $\pm$ 0.03       | -0.62 $\pm$ 0.38  | 0.37 $\pm$ 0.18       | 0.34 $\pm$ 0.13       | -0.08 $\pm$ 0.28  | 0.18 $\pm$ 0.13       | 0.11 $\pm$ 0.18       | 0.00 $\pm$ 0.18   |
| Weight <sub>130</sub> | 0.28 $\pm$ 0.07       | 0.99 $\pm$ 0.01       | -0.43 $\pm$ 0.69  | 0.97 $\pm$ 0.02       | 0.96 $\pm$ 0.03       | -0.15 $\pm$ 0.39  | 0.36 $\pm$ 0.17       | 0.33 $\pm$ 0.15       | 0.10 $\pm$ 0.31   | 0.11 $\pm$ 0.15       | 0.04 $\pm$ 0.16       | 0.14 $\pm$ 0.21   |

Condition factor = 100 x body weight x fork length<sup>-3</sup>; Subscript: age in days

**A. Navarro et al / Aquaculture (2009)**

Table 4. Phenotypic correlations (above the diagonal) and genetic correlations (in italics below the diagonal, with  $\pm$  standard error) between growth and carcass traits for gilthead seabream at harvest (509 days of age). Heritabilities in bold at the diagonal (with  $\pm$  standard error).

|                          | Weight <sub>509</sub> | Length <sub>509</sub> | CF <sub>509</sub> | GuttedW <sub>509</sub> | FilletW <sub>509</sub> | Dressing% <sub>509</sub> | Fillet% <sub>509</sub> |
|--------------------------|-----------------------|-----------------------|-------------------|------------------------|------------------------|--------------------------|------------------------|
| Weight <sub>509</sub>    | 0.34±0.06             | 0.91                  | 0.31              | 0.99                   | 0.90                   | -0.07                    | 0.02                   |
| Length <sub>509</sub>    | 0.97±0.01             | 0.33±0.07             | -0.09             | 0.92                   | 0.85                   | -0.01                    | 0.00                   |
| CF <sub>509</sub>        | 0.37±0.16             | 0.01±0.19             | 0.13±0.04         | 0.27                   | 0.30                   | -0.13                    | 0.16                   |
| GuttedW <sub>509</sub>   | 0.99±0.00             | 0.97±0.01             | 0.12±0.16         | 0.26±0.06              | 0.90                   | 0.04                     | 0.04                   |
| FilletW <sub>509</sub>   | 0.96±0.02             | 0.93±0.03             | 0.31±0.18         | 0.94±0.03              | 0.15±0.04              | 0.03                     | 0.46                   |
| Dressing% <sub>509</sub> | 0.02±0.18             | 0.12±0.16             | -0.43±0.08        | 0.14±0.20              | 0.14±0.23              | 0.31±0.07                | 0.18                   |
| Fillet% <sub>509</sub>   | -0.59±0.19            | -0.56±0.19            | -0.01±0.21        | -0.64±0.17             | -0.38±0.26             | -0.05±0.19               | 0.12±0.03              |

CF: condition factor (100 x body weight x fork length<sup>-3</sup>), GuttedW: gutted body weight, FilletW: fillet weight, Dressing%: dressing percentage (100 x gutted body weight x body weight<sup>-1</sup>), Fillet%: fillet percentage (100 x fillet weight x body weight<sup>-1</sup>). Subscript: age in days.

**4. Navarro et al. (enviado)**

---

## Estimates of heritabilities and genetic correlations for body composition traits and G x E interactions, in gilthead seabream (*Sparus auratus* L.).

Ana Navarro<sup>a</sup>, María J. Zamorano<sup>a</sup>, Silvia Hildebrandt<sup>a</sup>, Rafael Ginés<sup>a</sup>, Cristóbal Aguilera<sup>b</sup>, Juan M. Afonso<sup>a\*</sup>

<sup>a</sup>Universidad de Las Palmas de Gran Canaria (ULPGC). Instituto Universitario de Sanidad Animal y Seguridad Alimentaria (IUSA). Grupo de Investigación en Acuicultura (GIA). Trasmontaña s/n, 35413, Arucas, Las Palmas, Spain.

<sup>b</sup>IRTA. Centro de Acuicultura. Unidad de Cultivos Experimentales. Grupo de cultivo larvario y Nutrición. Ctra. Poble Nou Km 6, 43540 San Carlos de la Rápita, Tarragona, Spain.

\* Corresponding author. Tel.: +34 928 459735; Fax.: +34 928 451142; E-mail: [jafonso@cpat.ulpgc.es](mailto:jafonso@cpat.ulpgc.es)

### Abstract

In this study, for the first time on gilthead seabream (*Sparus auratus* L.), heritabilities for body composition traits, its genetic correlations with growth traits and the interaction genotype-environment (GxE), were estimated at 509 days (harvest size), from offspring of an industrial broodstock and reared in two different production systems (cages and tanks) in the Canary Island. A total of 867 offspring from an industrial mass spawning of 66 broodstocks were analysed. Parental assignment was inferred using the RimA multiplex PCR designed by Navarro et al. (2008) and 100% success was obtained. Of the 89 full-sib families obtained (between 1 and 53 descendents per family), 61 families were represented in the two facilities which were used for GxE interactions analysis, which showed low interaction in all characters. The heritability estimates were  $0.50 \pm 0.07$  for visceral fat percentage,  $0.05 \pm 0.03$  for muscular fat percentage,  $0.09 \pm 0.03$  for moisture,  $0.08 \pm 0.03$  for ash and  $0.02 \pm 0.01$  for collagen. The genetic and phenotypic correlations among body composition traits were mainly low, except moisture vs. muscle fat (-0.99 and -0.68, respectively) and dressing percentage vs. visceral fat (-0.92 and -0.51 respectively). For collagen content, genetic correlations were poorly consistent due to high standard errors. Regarding genetic correlations between body composition traits and growth traits were mostly low for length, and medium and high for condition factor which were positive for fat and ash, and negative for all other traits. All these phenotypic correlations were low. These data suggests a major indirect response of selection through length than directly for flesh composition and also that the inclusion of visceral fat percentage in a selection program would thwart the negative effect fat concentrated in the visceral cavity and increase the dressing percentage.

**Keyword:** heritability, genetic correlation, quality traits, flesh composition traits, gilthead seabream, *Sparus auratus*.

## 1. Introduction

Gilthead seabream (*Sparus aurata* L.) is one of the three most important cultured marine species in southern European countries. Gilthead seabream production has risen a 75% in the last 5 years in Europe and the Mediterranean basin, reaching 140,000 tons in 2007 (APROMAR, 2008).

Consumers of fish will not buy low-quality products, but, at the same time, they do not want to pay too high a price for superior quality (Gjedrem, 1997). This, jointly with the competitiveness of companies, has caused that the quality traits are becoming more and more important in the gilthead seabream industry. In this way, muscle composition plays an important role in aspects related to the fresh quality of fresh fish, such as flavor, juiciness, texture and appearance, and changes in it may have consequences on the market (Grigorakis, 2007). Flavor and juiciness are highly and positively correlated to fat contents in muscle (Grigorakis, 2007). The fat fraction is the component with the highest variation, even more if talking about a fatty or semi-fatty species where fat contents may vary between 3 and 15% (Zamil et al., 1992) like gilthead seabream. The variation of fat percentage is reflected in moisture percentage since fat and water constitute 80% of the fillet. Therefore, the higher the fat content, the less the moisture but the higher the juiciness (Grigorakis, 2007). In farmed fish, fat tend to increase with weight (Weatherley and Gill, 1983; Zhang et al., 1994), although they may also be influenced by the life cycle and the diet, whereas proteins and ash do not seem to be depend on the weight. 3-10% of the proteins are collagen, which constitutes the connective tissue among cells and is related to the fillet texture. Fillets with lower collagen content are more tender (Hatae et al., 1986) and the muscle is more likely to be fragmented in monomers (Sato et al., 1986). Collagen content has a positive and significant correlation with firmness of raw flesh (Hatae et al., 1986). On the other hand, fish with lower collagen content are more fibrous, dry and have less elasticity when cooked than those with a higher collagen content which are tender, succulent and elastic. This means that the texture of the cooked fish is affected by the muscular collagen-derived gelatine formed during the cooking process (Sato et al., 1986). Another important quality factor is the fat concentrated inside the visceral cavity as it affects negatively consumer's visual impression about the fish. The Visceral fat also has another negative effect which is a strong and not pleasant smell that it often comes out of well-fed aquaculture fish (Grigorakis, 2007). Moreover it represents lost energy since the visceral fat is thrown away together with the intestines when the fish is gutted.

Flesh composition is influenced by a variety of environmental factors such as abiotic (Ginés et al., 2004), nutritional (Izquierdo et al., 2005) or those related to the farming system (Grigorakis et al., 2002) and quality can therefore improved by considering adequate feeding and farming conditions. Also the genetic determination of part of the quality traits' variation can improve the composition of the fish and the flesh in a stable and accumulative way. In this sense, the estimation of genetic parameters for body composition traits have been described for several salmonid species (Gjerde and Schaeffer, 1989; Iwamoto et al., 1990; Elvingson and Nilsson, 1994; Rye and Gjerde, 1996; Kause et al., 2002; Neira et al., 2004; Tobin et al., 2006; Quinton et al., 2007; Vieira et al., 2007; Powel et al., 2008), for the channel catfish (*Ictalurus punctatus*) (El-Ibiary and Joyce, 1978) and for the European sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) (Haffray et al., 2007).

In this study, for the first time in gilthead seabream, heritabilities for body composition traits, its genetic correlations with growth traits and the interaction GxE, were estimated, from offspring of an industrial broodstock and reared in two different production systems (cages and tanks).

## 2. Materials and methods

### 2.1. Rearing conditions

An egg batch coming from a broodstock of the Tinamenor S.A. company (San Vicente de la Barquera, Cantabria, Spain) was cultured in the industrial facilities of the Instituto Canario de Ciencias Marinas (ICCM, Gran Canaria, Spain). Eggs and larvae were reared in the conditions described by Roo et al. (1999). Fingerlings were not graded in terms of deformities due to the stock's good quality (Afonso and Roo, 2007).

At 130 days post-hatching, all fish were taken to the facilities of the Playa de Vargas 2001 S.L. Company (PLV2001, Gran Canaria, Spain) and were reared in a cage, except a sample of 472 individuals, which remained in the on-growing facilities of the ICCM in tanks. Rearing conditions were the same as those used in Navarro et al. (2009). Both production systems, cages and tanks, are employed by the gilthead seabream industry in the Canary Islands.

### 2.2. Analyzed traits

At harvest size, at 509 post-hatching days, fish from ICCM (472 fish) and a sample of fish from PLV2001 (395 fish) were slaughtered and body weight and fork length were measured. Condition factor was calculated as follows:  $100 \times \text{body weight} \times \text{fork length}^{-3}$ . Visceral fat depots were manually removed, weighed and expressed as a percentage of the body weight, then, gutted body weight was recorded and also expressed as a percentage of the body weight (dressing percentage). Fish were skinned and filleted, and fillets were vacuum-packed and frozen prior to compositional analysis. Flesh composition was determined according to the standard method (AOAC 1990): moisture by drying at 104° C for 24 h, fat by extraction with petroleum ether by the Soxhlet method and ash by incineration at 550° C. All these traits were expressed as a percentage of fresh muscle weight. Muscle collagen content was evaluated according to the method described by Palka (1999), based on the determination of the hydroxyproline content in a muscle sample. To convert the quantity of hydroxyproline into collagen, a factor of 11.42 was used (Suarez et al., 2005), and expressed as  $\text{mgxg}^{-1}$  of fresh muscle. All composition analyses were performed in duplicate.

### 2.3. Genotyping and paternity

All fish were genetically characterized using the RimA multiplex microsatellite marker (Navarro et al., 2008). DNA extraction, PCR amplification and familial assignments were done as described in Navarro et al. (2009).

### 2.4. Data analysis

All data were tested for normality and homogeneity of variances, and visceral fat and composition traits were log-transformed. Then, they were analysed with SPSS (v15.0) (SPSS, Chicago, IL, USA) using a General Linear Model, in order to detect facility effect. The repeatability of the fillet composition analysis was calculated using the following linear model:

$$Y_{ij} = \mu + F_i + \varepsilon_{ij}$$

Being  $Y$  the fish data,  $\mu$  the population mean,  $F_i$  the replica fixed effect and  $\varepsilon_{ij}$  the residual error.



## ***A. Navarro et al / Aquaculture (enviado)***

Variance components for all traits were estimated by Restricted Maximum Likelihood (REML) using the following linear model:

$$y = X\beta + Zu + e$$

Being  $y$  the recorded data on the studied traits,  $\beta$  the facility fixed effect,  $u$  the random animal effect and  $e$  the error. The model was resolved with the software package VCE (v 5.1.2) (Kovač et al., 2002). The magnitude of estimated heritability was established, following the classification of Cardellino and Rovira (1987), as low (0.05–0.15), medium (0.20–0.40), high (0.45–0.60), and very high (> 0.65). Correlations were classed as low (0–0.40), medium (0.45–0.55) and high (0.60–1), regardless of the sign.

Genotype-environment interactions were estimated through two methods:

Method I: Using the following linear model with SPSS (v15.0):

$$y = \mu + \alpha_i + \beta_j + \delta_{ij} + \varepsilon_{ijk}$$

Being  $y$  the phenotypic value,  $\mu$  the population mean,  $\alpha_i$  the family,  $\beta_j$  the facility,  $\delta_{ij}$  the family-facility interaction and  $\varepsilon_{ijk}$  the error.

Method II: Estimating genetic correlations between a trait in the PLV2001 facilities and the same trait in the ICCM facilities with VCE (v 5.1.2).

### **3. Results**

#### ***3.1. Phenotypic results***

Phenotypic results and coefficients of variation for body composition traits (muscle fat, moisture, ash, collagen, visceral fat and dressing percentage) and growth traits (fork length and condition factor) at each facility and overall are shown in Table 1. There were significant differences between facilities for all traits ( $P < 0.05$ ), except collagen ( $P = 0.06$ ). Fish cultured at PLV2001 showed higher growth and fat (visceral and muscular) values than those cultured at ICCM, while values for the other traits were lower. Coefficients of variation ranged from 1.62 to 44.56 % for body composition traits and were about 6 % for growth traits.

Repeatability and coefficients of variation (CV) between replicas for each flesh composition trait are shown in Table 2. As can be observed, all correlations were significant and higher than 50%. According to coefficients of variation, all values between replicas were lower than between samples (Table 1).

#### ***3.2. Heritabilities and correlations***

Estimations for heritabilities for each trait and genetic and phenotypic correlations among them are shown in Table 3. Heritabilities ranged from 0.02 to 0.50 for body composition traits and from 0.13 to 0.33 for growth traits. The genetic and phenotypic correlations among body composition traits were mainly low, except moisture vs. muscle fat and dressing percentage vs. visceral fat, which were negative and high. For collagen content, genetic correlations were poorly consistent due to high standard errors. Regarding genetic correlations between body composition traits with growth traits were low for length except collagen, and medium and high for condition factor which were positive for fat and ash, and negative for all other traits. All these phenotypic correlations were low.

### *3.4. Familial assignments and GxE Interactions*

Each offspring was assigned to a single parent pair (100% of success in paternity inference). Out of the 66 breeders, 17 females and 11 males, contributed to the spawn, and a total of 89 full-sib families (eight paternal half-sib families and 16 maternal half-sib families) were obtained with a mean of 9.7 descendents per family, ranged between 1 and 53. 61 families were represented in the two facilities which were used for GxE interactions analysis. As can be observed in Table 4, through method I the interaction between facility and family effects was not significant ( $P>0.05$ ) for neither of the traits. According to genetic correlations between the same traits in each facility (method II), these ranged from 0.15 to 0.99, with a mean value of 0.9 for carcass traits and 0.3 for flesh composition traits.

## **4. Discussion**

### *4.1. Phenotypic results*

Quality traits are becoming more and more important in the aquaculture industry due to consumer demand. Muscle composition plays a determinant role in these traits (Gjedrem, 1997). In cultured gilthead seabream the described fat percentage in muscle is very varying, ranging from 3 to 11% (Grigorakis, 2007), and inversely proportional to moisture. Robaina et al. (1997), obtained fat-moisture values of 8.3-69.3% and 9.8-68.1% under different experimental diets. Flos et al. (2002), described a significant effect of density and feeding system on fat-moisture estimates with values of 2.53-73.94% for high density and manual feeding and values of 5.98-71.67% for low density and a self-feeding system. Also for gilthead seabream, Ginés et al. (2004) obtained statistically different fat-moisture values for fish cultured under artificial (5.55-70.96%) and natural photoperiod (6.02-69.77%). Unlike fat, the ashes percentage in muscle shows little variation and ranges from 1.2 to 1.6% (Grigorakis, 2007). All these values for fat, moisture and ashes are in agreement with the results obtained in this study, not only for the mean values but also for the inverse relation between fat and moisture. Regarding the percentage of total collagen in muscle, Sato et al. (1986), who used the same method as the one in this study, described values for 24 fish species that varied between 3.4 and 21.9 mg/g depending both on the species and on factors like the muscular area, the slaughter season, nutritional conditions or the age. In gilthead seabream, Suárez et al. (2005) studied the changes in muscle collagen contents after several hours of storage on ice and observed a statistically significant decrease. All these effects are in agreement with results obtained in this study where values were slightly lower than those of Sato et al. (1986) since the amount of collagen in muscle was the last parameter which was analyzed after a storage period.

Another aspect of fish quality is the amount of visceral fat (Gjedrem, 1997). In the case of gilthead seabream there are less data than for muscular composition but the described values range from 0.79 to 2.98%, expressed as percentage of total fish weight (Santinha et al., 1999; Grigorakis et al., 2002; Grigorakis and Alexis, 2005), which also match up with our results.

### *4.2. Heritabilities and correlations*

In fish there has been described a wide range of values for heritabilities related to quality characters. With regard to flesh composition characters, muscular fat has been the most studied one. For salmonids values have been generally medium (0.16-0.30) (Iwamoto et al., 1990; Rye and Gjerde, 1996; Kause et al., 2002; Neira et al., 2004; Vieira et al., 2007; Powel et al., 2008), but also high values (0.47) (Gjerde and Schaeffer, 1989) and even low values (0-0.14) (Elvingson and Nilsson, 1994; Tobin et al., 2006) have been described.

## **A. Navarro et al / Aquaculture (enviado)**

In European sea bass, Haffray et al. (2007) obtained high heritability estimates (0.43-0.77) while in channel catfish, El-Ibiary and Joyce (1978) described a low additive genetic variation (0-0.08), which is in agreement with the estimates done in this study for gilthead seabream. In the case of moisture percentage, heritability estimates are also quite heterogeneous. While Iwamoto et al. (1990), Rye and Gjerde (1996) and Gjerde and Schaeffer (1989) obtained medium values (0.14-0.30), those obtained by Elvingson and Nilsson (1994) were low (0.11). In rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*), Kause et al. (2002) described low values for both moisture and ashes (0.06) similar to those obtained in this study. As for collagen, which reflects the texture of the meat (Hatae et al., 1986), the low heritabilities obtained in this study are the first ones for fish. On the contrary, visceral fat did show a high additive genetic variation, even higher than that described for other species but in agreement with those (0.10-0.35) (Gjerde and Schaeffer, 1989; Rye and Gjerde, 1996; Kause et al., 2002; Neira et al., 2004).

At the phenotypic level, the positive correlation between the weight of the fish and the amount of fat (both muscular and visceral) has broadly been described both in salmonids (Gjedrem, 1997) and in gilthead seabream (Ginés et al., 2004; Grigorakis and Alexis, 2005). The sense of the correlations between muscular fat and growth (weight or length) is kept also at the genetic level in Coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*) (Iwamoto et al., 1990; Neira et al., 2004) and in Atlantic salmon (*Salmo salar*) (Powel et al., 2008) with values between 0.24 and 0.76. On the contrary, in rainbow trout, Gjerde and Schaeffer (1989) and Kause et al. (2002) obtained negative correlation values (-0.19 y -0.12, respectively). In the case of salmonids, a positive correlation has a negative effect since these are species with a high muscular fat content and high values reduce the meat quality (Powel et al., 2008), whereas in gilthead seabream an increase in muscular fat content would favor the juiciness and flavor of flesh fish. Therefore, a positive genetic correlation between length and muscular fat percentage would indirectly improve flesh quality through growth. In this study it seems to be a positive correlation but with low consistency due to the high standard error. In connection with fat and moisture contents in muscle, both phenotypic and genetic correlations in this study are in agreement with those described for other species. Kause et al. (2002), in rainbow trout, and Iwamoto et al. (1990), in Coho salmon, described genetic correlations of -0.96 y -0.49, respectively. On the other hand, Neira et al. (2004) described a high and positive correlation between meat texture and weight (0.30-0.70) in Coho salmon. Estimates of this character are scarce due to the difficulty of measuring it in a representative number of fresh fish (Gjedrem, 1997) but texture can also be indirectly assessed through its relationship with collagen whose high contents have a positive effect on the texture of both fresh (Hatae et al., 1986) and cooked meat (Sato et al., 1986). In this way, the positive genetic correlation between collagen percentage and length, estimated in this study, seem indicate an improvement of texture with growth although the consistency of the values is low due to the high standard error. However, the high and negative correlation between collagen percentage and condition factor is more consistent suggesting that an improvement in growth would not change collagen percentage unless changes in shape occur. This seems to be a positive aspect due to the genetic correlation between collagen and moisture, which is inversely correlated with muscular fat.

In the case of visceral fat, Neira et al. (2004) estimated in Coho salmon different genetic correlations with weight depending on age class whereas in rainbow trout Gjerde and Schaeffer (1989) obtained low and positive values. These data coincide with those obtained in this study where genetic correlation between visceral fat and weight was low and positive (data not shown) and between visceral fat and length was low and positive. This is also in agreement with results obtained for the condition factor whose genetic and phenotypic correlations with visceral fat were positive. Grigorakis and Alexis (2005), also described a positive phenotypic correlation between visceral fat percentage and condition factor for gilthead seabream. Regarding genetic correlations with dressing percentage, these are very consistent among species. For salmonids (Rye and Gjerde, 1996; Kause et al., 2002; Neira et al. 2004), European sea bass (Haffray et al., 2007) and also in this study values were high and negative (from -0.44 to -0.98). This fact, together with the high heritability of visceral fat percentage in gilthead seabream, suggests that the inclusion of this character in a selection program would thwart the negative effect fat concentrated in the visceral cavity has on consumers

## ***A. Navarro et al / Aquaculture (enviado)***

(Grigorakis, 2007). This issue becomes especially important since marketing of filleted seabream is growing (Luna, 2006). Similar conclusions have been reported for Atlantic salmon (Rye and Gjerde, 1996).

Navarro et al. (2009) proposed to use length instead of weight as a selection criterion in a gilthead seabream improvement program due to its higher repeatability and easiness to measure during field work. Moreover, these authors estimated a genetic correlation that was positive between condition factor and weight and null between condition factor and length, thus improved fish would not show any changes in conformation and therefore not affect the consumer assessment (Elvingson and Johansson, 1993). Moreover, keeping in mind genetic correlations of visceral fat estimated in this study, an increase in the condition factor through a selection of the weight would lead to an increase in visceral fat percentage and a reduction of the dressing percentage but through length, meat yield would not be affected. In this way, genetic correlations of flesh composition suggest that an improvement of growth through length would neither affect collagen percentage but, given the correlation between length and moisture, it would indirectly favor muscular fat percentage, improving flesh quality.

### ***4.2. GxE Interactions***

In geographically wide spread species, like gilthead seabream and sea bass, it may be of interest to estimate the interaction genotype-environment since companies may would like to export their production to different countries or on-growing conditions. It would even be advisable to establish specific selection programs or selection lines for each environment (Dupont-Nivet et al., 2008). However, it is to be expected that when all descendents come from the same genetic background or broodstock and are reared in similar environmental conditions, interactions will be faint, as described in other species. For growth characters, Fishback et al. (2002) estimated in rainbow trout, high genetic correlations between weight and length in fish reared at different temperatures while Palti et al. (2006) found similar ranking in families fed with different diets. Ponzoni et al. (2005) found, in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*), a similar response for the weight of fish reared both in tanks and in cages. In European sea bass, Dupont-Nivet et al. (2008) did not find any GxE interaction among the weights of fish cultured at three farms with similar on-growing systems. Hanke et al. (1989) obtained, in Atlantic salmon the same ranking for families reared under two systems with different photoperiod. All this is in agreement with the absence of GxE interaction for growth characters and carcass traits found in this study.

GxE interactions in flesh composition characters among different diets have been studied. For fat percentage and muscular protein, Tobin et al. (2006) found similar family rankings in rainbow trout. The same way, Quinton et al. (2007) in European whitefish (*Coregonus lavaretus* L.) estimated high genetic correlations among diets for both characters although these were lower and with higher standard errors than those for growth variables. In our study, genetic correlations among stations for composition variables were also lower than those for growth and its standard errors where higher. This can be due to the fact that these variables have the lowest heritability and the family factor gets lost.

### **5. Conclusion**

This study reports, for the first time for gilthead seabream, estimations of genetic parameters for flesh composition and visceral fat percentage traits, which denote scarce and high additive genetic components, respectively. Moreover, the genetic correlation of body composition traits with length suggests a major indirect response of selection through length than directly from body composition traits, and especially for flesh composition. Furthermore, descendents of the same families, grown at different industrial culture conditions, used both in the Canary Islands and other latitudes (tank and cage), showed low genotype-environment interaction.

## Acknowledgments

The authors wish to thank everyone who participated in the fish assessment and the flesh composition analysis, especially to Manola Martel and Eduardo Araujo. We are also grateful to Tinamenor S.L Company for the fins of breeders, to Playa de Vargas 2001 S.L. Company and the ICCM staff for their help during fish on-growing. Special thanks are also given to Piluca Abaunza for her time and patience. This study was supported by projects of the Canary Government (PI2000/63, PI2002/212) and a grant from the University of Las Palmas de Gran Canaria for Ana Navarro.

## References

- Afonso, J.M., Roo, F.J., 2007. Anomalías morfológicas en peces cultivados: heredabilidad y selección. In Martínez, P., Figueras, A. (Eds), *Genética y genómica en acuicultura*. C.S.I.C., Madrid, pp. 213-240.
- AOAC, 1990. *Official Methods of Analysis, Vols I and II*. 15<sup>th</sup> edition. Association of Official Analytical Chemists, Arlington, VA, USA. 1298 pp.
- APROMAR, 2008. *La acuicultura marina de peces en España*.
- Dupont-Nivet, M., Vandeputte, M., Vergnet, A., Merdy, O., Haffray, P., Chavanne, H., Chatain, B., 2008. Heritabilities and GxE interactions for growth in the European Sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) using a marker-based pedigree. *Aquaculture* 275, 81-87.
- El-Ibiary, H.M., Joyce, J.A., 1978. Heritability of body size traits, dressing weight and lipid content in channel catfish. *J.Anim.Sci.*, 47, 82-88 .
- Elvingson, P., Nilsson, J., 1994. Phenotypic and genetic parameters of body and compositional traits in Arctic charr, *Salvelinus alpinus* (L.). *Aquacult. Fish. Manage.* 25, 677-685.
- Elvingson, P., Johansson, K., 1993. Genetic and environmental components of variation in body traits of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) in relation to age. *Aquaculture* 118, 191-204.
- Fishback, A.G., Danzmann, R.G., Ferguson, M.M., Gibson, J.P., 2002. Estimates of genetic parameters and genotype by environment interactions for growth traits of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) as inferred using molecular pedigrees. *Aquaculture* 206, 137-150.
- Flos, R., Reig, L., Oca, J., Ginovart, M., 2002. Influence of marketing and different land-based system on gilthead sea bream (*Sparus aurata*) quality. *Aquac. Int.* 10, 189-206.
- Ginés, R., Afonso, J.M., Argüello, A., Zamorano, M.J., López, J.L., 2004. The effects of long-day photoperiod on growth, body composition and skin colour in immature gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.). *Aquac. Res.* 35, 1207-1212.
- Gjedrem, T., 1997. Flesh quality improvement in fish through breeding. *Aquac. Int.* 5, 197-206.
- Gjerde, B., Schaeffer, L.R., 1989. Body traits in rainbow trout II. estimates of heritabilities and of phenotypic and genetic correlations. *Aquaculture* 80, 25-44.
- Grigorakis, K., 2007. Compositional and organoleptic quality of farmed and wild gilthead sea bream (*Sparus aurata*) and sea bass (*Dicentrarchus labrax*) and factors affecting it: A review. *Aquaculture* 272, 55-75.
- Grigorakis, K., Alexis, M.N., 2005. Effects of fasting on the meat quality and fat deposition of commercial-size farmed gilthead sea bream (*Sparus aurata*, L.) fed different dietary regimes. *Aquacult. Nutr.* 11, 341-344.
- Grigorakis, K., Alexis, M.N., Taylor, K.D.A., Hole, M., 2002. Comparison of wild and cultured gilthead sea bream: composition, appearance and seasonal alterations. *Int. J. Food Sci. Technol.* 37, 477-484.
- Haffray, P., Pincet, C., Dupont-Nivet, M., Vandeputte, M., Merdy, O., Chavanne, H., Chatain, B., 2007. Heritabilities and GxE interactions for quality traits in the European sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.). In: Vandeputte, M., Chatain, B., Hulata, G. (Eds.), *Genetics in Aquaculture: Proceedings of the Ninth International Symposium*, 26–30 June 2006, Montpellier, France. *Aquaculture*, vol. 272, pp. 265. Supplement 1.

## ***A. Navarro et al / Aquaculture (enviado)***

- Hanke, A.R., Friars, G.W., Terhune, J.M., 1989. Family x photoperiod interaction on growth in juvenile Atlantic salmon, *Salmo salar*. *Genome* 32, 1105-1112.
- Hatae, K., Tobimatsu, A., Takeyama, M., Matsumoto, J.J., 1986. Contribution of the connective tissues on the texture difference of various fish species. *Nippon Suisan Gakkaishi* 52, 2001-2007.
- Iwamoto, R.N., Myers, J.M., Hershberger, W.K., 1990. Heritability and genetic correlations for flesh coloration in pen-reared coho salmon. *Aquaculture* 86, 181-190.
- Izquierdo, M.S., Montero, D., Robaina, L., Caballero, M.J., Rosenlund, G., Ginés, R., 2005. Alterations in fillet fatty acid profile and flesh quality in gilthead seabream (*Sparus aurata*) fed vegetable oils for a long term period. Recovery of fatty acid profiles by fish oil feeding. *Aquaculture* 250, 431-444.
- Kause, A., Ritola, O., Paananen, T., 2002. Coupling body weight and its composition: a quantitative genetic analysis in rainbow trout. *Aquaculture* 211, 65-79.
- Kovač, M., Groeneveld, E., García-Cortés, L.A., 2002. VCE-5: A package for the optimization of dispersion parameters. Proceedings of the 7<sup>th</sup> World Congress on Genetics Applied to Livestock Production, 20-23 August 2002, Montpellier, France.
- Luna, L., 2006. La demanda de filete de dorada en el mercado español en el mercado de la dorada y la lubina en la Unión Europea en el periodo 2003-2006. Informe de la Secretaría General de Pesca Marítima del Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación del Gobierno de España.
- Navarro, A., Badilla, R., Zamorano, M.J., Pasamontes, V., Hildebrandt, S., Sánchez, J.J., Afonso, J.M., 2008. Development of two new microsatellite multiplex PCRs for three sparid species: gilthead seabream (*Sparus auratus* L.), red porgy (*Pagrus pagrus* L.) and redbanded seabream (*P. auriga*, Valenciennes, 1843) and their application to paternity studies. *Aquaculture*, doi: 10.1016/j.aquaculture.2008.07.005
- Navarro, A., Zamorano, M.J., Hildebrandt, S., Ginés, R., Aguilera, C., Afonso, J.M., 2009. Estimates of heritabilities and genetic correlations for growth and carcass traits in gilthead seabream (*Sparus auratus* L.), under industrial conditions. *Aquaculture*, accepted.
- Neira, R., Lhorente, J.P., Araneda, C., Díaz, N., Bustos, E., Alert, A., 2004. Studies on carcass quality traits in two populations of Coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*) phenotypic and genetic parameters. *Aquaculture* 241, 117-131.
- Palka, K., 1999. Changes in intramuscular connective tissue and collagen solubility of bovine *m. semitendinosus* during retorting. *Meat Science* 53, 189-194.
- Palti, Y., Silverstein, J.T., Wieman, H., Philips, J.G., Barrows, F.T., Parsons, J.E., 2006. Evaluation of family growth response to fishmeal and gluten-based diets in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture* 255, 548-556.
- Ponzoni, R., Hanzah, A., Tan, S., kamaruzzaman, N., 2005. Genetic parameters and response to selection for live weight in the GIFT strain of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Aquaculture* 247, 203-210.
- Powell, J., White, I., Guy, D., Brotherstone, S., 2008. Genetic parameters of production traits in atlantic salmon (*Salmo salar*). *Aquaculture* 274, 225-231.
- Quinton, C.D., Kause, A., Ruohonen, K., Koskela, J., 2007. Genetic relationships of body composition and feed utilization traits in european whitefish (*Coregonus lavaretus* L.) and implications for selective breeding in fishmeal- and soybean meal-based diet environments. *J. Anim. Sci.* 85, 3198-3208.
- Robaina, L., Moyano, F.J., Izquierdo, M.S., Socorro, J., Vergara, J.M., Montero, D., 1997. Corn gluten and meat and bone meals as protein sources in diets for gilthead seabream (*Sparus aurata*): Nutritional and histological implications. *Aquaculture* 157, 347-359.
- Roo, F.J., Socorro, J., Izquierdo, M.S., Caballero, M.J., Hernandez-Cruz, C.M., Fernandez, A., Fernandez-Palacios, H., 1999. Development of red porgy *Pagrus pagrus* visual system in relation with changes in the digestive tract and larval feeding habits. *Aquaculture* 179, 499-511
- Rye, M., Gjerde, B., 1996. Phenotypic and genetic parameters of body composition traits and flesh colour in Atlantic salmon, *Salmo salar* L. *Aquacult. Res.* 27, 121-133.

## **A. Navarro et al / Aquaculture (enviado)**

- Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T., 1989. Molecular Cloning. A laboratory manual. 2<sup>nd</sup> edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, N.Y.
- Santina, P.J.M., Medale, F., Corraze, G., Gomez, E.F.S., 1999. Effects of the dietary protein: lipid ratio on growth and nutrient utilization in gilthead seabream (*Sparus aurata* L.). *Aquac. Nutr.* 5, 147-156.
- Sato, K, Yoshinaka, R, Sato, M, Ikeda, S., 1986. A simplified method for determining collagen in fish muscle. *Nippon Suisan Gakkaishi* 52, 889–893.
- Suárez, M.D., Abad, M., Ruiz-Cara, T., Estrada, J.D., García-Gallego, M., 2005. Changes in muscle collagen content during post mortem storage of farmed sea bream (*Sparus aurata*): Influence on textural properties. *Aquac. Int.* 13, 315-325.
- Tobin, D., Kause, A., Mantysaari, E.A., Martin, S.A.M., Houlihan, D.F., Dobby, A., Kiessling, A., Rungruangsak-Torrissen, K., Ritola, O., Ruohonen, K., 2006. Fat or lean? The quantitative genetic basis for selection strategies of muscle and body composition traits in breeding schemes of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture* 261, 510-521.
- Vieira, V., Norris, A., Johnston, I.A., 2007. Heritability of fibre number and size parameters and their genetic relationship to flesh quality traits in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). In: M., Vandeputte, Chatain B., Hulata G. (eds.), *Genetics 397 in Aquaculture: Proceedings of the Ninth International Symposium, 26-30 June 2006, Montpellier, France.* *Aquaculture*, 272, Supplement 1, 100-109.
- Weatherley, A.H., Gill H.S., 1983. Protein, lipid, water and caloric contents of immature rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson, growing at different rates. *J. Fish Biol.* 23, 653-673.
- Zamil, M., Rawdah, T., Attar, K., Arab, M., 1992. Mineral and proximate composition of some commercially important fish of the Arabian Gulf. *Food Chem.* 45, 95-8.
- Zhang, Q., Reigh R.C., Wolters, W.R., 1994. Growth and body composition of pond-raised hybrid striped basses, *Morone saxatilis* x *M. chrysops* and *M. saxatilis* x *M. mississippiensis*, fed low and moderate levels of dietary lipid. *Aquaculture* 125, 119-129.

**A. Navarro et al / Aquaculture (enviado)**

Table1. Phenotypic results and coefficients of variation (CV) for growth, carcass and flesh composition traits (mean  $\pm$  standard error) at harvest age (509 days) for each facility and overall (ICCM: Instituto Canario de Ciencias Marinas, PLV2001: Playa de Vargas 2001 S.L.).

| Trait                                  | ICCM             | PLV2001          | Overall          | CV (%) |
|--|------------------|------------------|------------------|--------|
| Fork length (cm)                       | 25.40 $\pm$ 0.07 | 27.66 $\pm$ 0.07 | 26.42 $\pm$ 0.06 | 5.14   |
| Condition factor (g·cm <sup>-3</sup> ) | 2.21 $\pm$ 0.01  | 2.28 $\pm$ 0.01  | 2.24 $\pm$ 0.01  | 6.95   |
| Dressing percentage (%) <sup>a</sup>   | 92.98 $\pm$ 0.07 | 90.37 $\pm$ 0.07 | 91.73 $\pm$ 0.07 | 1.62   |
| Visceral fat (%) <sup>a</sup>          | 1.98 $\pm$ 0.05  | 2.64 $\pm$ 0.05  | 2.30 $\pm$ 0.04  | 44.56  |
| Muscle fat (%) <sup>b</sup>            | 7.40 $\pm$ 0.10  | 10.90 $\pm$ 0.10 | 9.08 $\pm$ 0.09  | 21.61  |
| Moisture (%) <sup>b</sup>              | 70.57 $\pm$ 0.09 | 67.60 $\pm$ 0.09 | 69.14 $\pm$ 0.08 | 2.65   |
| Ash (%) <sup>b</sup>                   | 1.51 $\pm$ 0.01  | 1.42 $\pm$ 0.01  | 1.47 $\pm$ 0.00  | 9.17   |
| Collagen (mg/g) <sup>c</sup>           | 0.68 $\pm$ 0.01  | 0.39 $\pm$ 0.01  | 0.54 $\pm$ 0.01  | 37.07  |

<sup>a</sup> calculated as percentage of body weight, <sup>b</sup> calculated as percentage of wet muscle, <sup>c</sup> calculated as mg per g of wet muscle.



**A. Navarro et al / Aquaculture (enviado)**

Table 2. Repeatability and coefficients of variation (CV) between replicas for each flesh composition trait.

| Flesh composition Trait | Correlation | CV (%) |
|-------------------------|-------------|--------|
| Muscle fat              | 0.97**      | 3.12   |
| Moisture                | 0.99**      | 0.29   |
| Ash                     | 0.59**      | 4.94   |
| Collagen                | 0.85**      | 14.12  |

\*\*P<0.01

**A. Navarro et al / Aquaculture (enviado)**

Table 3. Phenotypic correlations (above the diagonal), genetic correlations (in italics below the diagonal, with  $\pm$  standard error) and heritabilities (in bold at the diagonal, with  $\pm$  standard error) of body composition and growth traits at harvest age (509 days).

|           | Length            | CF                | Dressing%         | VisFat%           | MusFat%           | Moisture%         | Ash%              | Collagen         |
|-----------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|------------------|
| Length    | <b>0.33±0.07</b>  | -0.09             | -0.01             | 0.09              | 0.08              | -0.16             | 0.04              | -0.07            |
| CF        | <i>0.01±0.19</i>  | <b>0.13±0.04</b>  | -0.13             | 0.14              | 0.10              | -0.15             | 0.12              | -0.01            |
| Dressing% | <i>0.12±0.16</i>  | <i>-0.43±0.08</i> | <b>0.31±0.07</b>  | -0.51             | -0.11             | 0.05              | -0.08             | 0.02             |
| VisFat%   | <i>-0.09±0.17</i> | <i>0.69±0.12</i>  | <i>-0.92±0.04</i> | <b>0.50±0.07</b>  | 0.07              | -0.11             | 0.12              | -0.06            |
| MusFat%   | <i>0.16±0.21</i>  | <i>0.24±0.25</i>  | <i>-0.02±0.33</i> | <i>0.01±0.26</i>  | <b>0.05±0.03</b>  | -0.68             | -0.08             | -0.31            |
| Moisture% | <i>-0.32±0.16</i> | <i>-0.43±0.13</i> | <i>-0.47±0.26</i> | <i>0.13±0.23</i>  | <i>-0.99±0.02</i> | <b>0.09±0.03</b>  | 0.02              | 0.29             |
| Ash%      | <i>-0.07±0.14</i> | <i>0.59±0.18</i>  | <i>-0.42±0.20</i> | <i>0.69±0.13</i>  | <i>0.01±0.22</i>  | <i>-0.12±0.28</i> | <b>0.08±0.03</b>  | 0.00             |
| Collagen  | <i>0.78±0.44</i>  | <i>-0.89±0.16</i> | <i>0.16±0.41</i>  | <i>-0.21±0.44</i> | <i>-0.27±0.44</i> | <i>0.55±0.19</i>  | <i>-0.12±0.46</i> | <b>0.02±0.01</b> |

Length: fork length, CF: condition factor ( $100 \times \text{body weight} \times \text{fork length}^{-3}$ ), dressing%: dressing percentage ( $100 \times \text{gutted body weight} \times \text{body weight}^{-1}$ ), VisFat%: visceral fat percentage, MusFat%: muscle fat percentage.

**A. Navarro et al / Aquaculture (enviado)**

Table 4. Genotype-environment interactions (p value) and genetic correlations between facilities ( $\pm$  standard error) for each trait.

| Trait                       | P value | Genetic correlation |
|-----------------------------|---------|---------------------|
| Fork length                 | 0.39    | 0.70 $\pm$ 0.12     |
| Condition factor            | 0.98    | 0.99 $\pm$ 0.13     |
| Dressing % <sup>a</sup>     | 0.68    | 0.90 $\pm$ 0.18     |
| Visceral fat % <sup>a</sup> | 0.92    | 0.81 $\pm$ 0.22     |
| Muscle fat % <sup>b</sup>   | 0.12    | 0.15 $\pm$ 0.94     |
| Moisture % <sup>b</sup>     | 0.07    | 0.22 $\pm$ 0.98     |
| Ash % <sup>b</sup>          | 0.96    | 0.27 $\pm$ 0.66     |
| Collagen <sup>c</sup>       | 0.74    | 0.51 $\pm$ 0.35     |

<sup>a</sup> calculated as percentage of body weight, <sup>b</sup> calculated as percentage of wet muscle, <sup>c</sup> calculated as mg per g of wet muscle.