



UNIVERSIDAD DE LAS PALMAS DE GRAN CANARIA



UNIVERSIDAD DE LAS PALMAS DE GRAN CANARIA
Instituto Universitario de Sanidad Animal y Seguridad
Alimentaria

TESIS DOCTORAL

**DESARROLLO DE UN PROGRAMA PILOTO A NIVEL NACIONAL DE
MEJORA GENÉTICA EN DORADA (*Sparus aurata* L.): ESTIMACIÓN DE
PARÁMETROS GENÉTICOS DE CARACTERES DE CRECIMIENTO Y
CALIDAD E INTERACCIÓN GENOTIPO AMBIENTE**

Ivonne Lee Montero

Las Palmas de Gran Canaria, 2012

ANEXO II

UNIVERSIDAD DE LAS PALMAS DE GRAN CANARIA

Instituto Universitario de Sanidad Animal y Seguridad Alimentaria

PROGRAMA DE DOCTORADO TITULADO

“ACUICULTURA: PRODUCCIÓN CONTROLADA DE ANIMALES ACUÁTICOS”

Tesis Doctoral presentada por **Dña. Ivonne Carola Lee Montero**

Dirigida por el **Dr. Juan Manuel Afonso López** y la **Dra. Ana Navarro y Guerra del Río**

El Director

La Directora

La Doctoranda

**Juan Manuel
Afonso López**

**Ana
Navarro y Guerra del Río**

**Ivonne
Lee Montero**

Las Palmas de Gran Canaria, 2012

Juan Manuel Afonso López, Profesor Titular de Universidad perteneciente al Departamento de Patología Animal, Producción Animal, Bromatología y Ciencia y Tecnología de los Alimentos e investigador del Instituto de Sanidad Animal y Seguridad Alimentaria de la Universidad de Las Palmas de Gran Canaria,

Ana Navarro y Guerra del Río, Profesora asociada laboral del Departamento de Patología Animal, Producción Animal, Bromatología y Ciencia y Tecnología de los Alimentos e Investigadora del Instituto de Sanidad Animal y Seguridad Alimentaria de la Universidad de Las Palmas de Gran Canaria,

INFORMAN:

Que Ivonne Lee Montero, Bióloga Marina de la Universidad de Concepción y Magister en Ciencias de la Acuicultura de la Universidad de Chile, ambas universidades pertenecientes al Gobierno de Chile, con título homologado por el Ministerio de Educación Español al Grado de Licenciada, ha realizado bajo nuestra dirección y asesoramiento, el presente trabajo titulado **Desarrollo de un programa piloto a nivel nacional de mejora genética en dorada (*Sparus aurata* L.): estimación de parámetros genéticos de caracteres de crecimiento y calidad e interacción genotipo ambiente**, el cual consideramos reúne las condiciones y la calidad científica para optar al grado de Doctora.

En Las Palmas de Gran Canaria, a 01 de Octubre de 2012.

Fdo.: Juan Manuel Afonso López

Fdo.: Ana Navarro y Guerra del Río

**A DIOS y a mi hermosa y gran Familia,
a todos con Amor...**

“Buena es la ciencia con herencia, y provechosa para los que ven el sol”

Eclesiastés 7:11

AGRADECIMIENTOS

Bien...iré escribiendo los agradecimientos en la medida que se me vayan viniendo a la mente, que te nombre antes o después no tiene ninguna importancia, me siento igual de agradecida por lo que eres, representas o has hecho por mí y este trabajo durante estos años de estudio...

Vamos a empezar:

¡Gracias Señor!, sin ti mi sueño no se hubiera hecho realidad, eres lo más importante en mi vida, me siento tu “regalona” por tus cuidados, tus regalos inmerecidos, tu paciencia, tu misericordia y sobre todo por la vida y la salud que me distes y que me permitió terminar este hermoso trabajo (sin presumir, ¡es que a mí me parece hermoso! Lo bueno de esta sección es que uno puede escribir lo que quiera).

Gracias a los que me animaron incluso mucho antes de que este proyecto se concretara, y me dieron las fuerzas para soñar. A mis queridos padres, mi papá y mi mamá, Guillermo y Nancy, son los mejores padres del mundo, ustedes reflejan el amor que todos deberíamos entregar al prójimo sin pedir nada a cambio...gracias porque siempre me han apoyado, han sido súper comprensivos a pesar de mis errores, me han enseñado a soñar y que no hay nada que no se pueda lograr con la ayuda de Dios y siendo una buena persona...a ustedes les debo todo en este mundo...¡los amo mucho!...y por supuesto a mis hermanos Pauli, Katy, Vivi y Willi (sí, todos terminados en “i”, pregúntenle a nuestra madre...) y a sus familias...a mis tíos, tías, primas y primos, cuñados, cuñada...la lista es larga.

A mi familia chica, en primer lugar a mi esposo y compañero de esta aventura en esta tierra Canaria, gracias por apoyarme siempre sin esperar nada a cambio, ¡sin ti no hubiera podido concretar este proyecto!, gracias por tu paciencia conmigo, por tu contención en los momentos difíciles, por ocuparte de todo cuando yo no tenía tiempo y por esperarme cuando decía que llegaría a una hora y luego llegaba mucho más tarde...en fin ¡muchas gracias por todo!. A mi amado hijo Daniel, que de sus 6 añitos, 4 han sido con su madre trabajando como loca en sus tesis (cada uno trabaja como puede...). A mis suegros Hugo y Eva, gracias por su apoyo y preocupación a la distancia, y a mis cuñados y cuñada.

Un sitio especial en esta sección se la dedicaré a la hermosa hija que Dios me dio, a mi querida Carolita: “hermosa a veces la vida no es como quisiéramos, sé que para ti pudo ser difícil todo lo que has pasado... y mantenernos alejadas tanto tiempo, pero mi amor, tú sabes que te amo y que gran parte de las decisiones profesionales y personales que he tomado a lo largo de tus 16 añitos, han sido para que tu estés mejor...¡espero no haberme equivocado!, eres una jovencita con un gran corazón y estoy segura que Dios te ayudará a seguir adelante y conseguir tus sueños, al igual como lo ha hecho hasta ahora... gracias por lo bien que te has portado durante este tiempo lejos, por cuidar de tu padre y cumplir con

“sobresaliente” tus deberes, gracias por ser como eres, me siento orgullosa de ti... ¡¡te amo del cielo a las estrellas, ida y vuelta!!, tú lo sabes...

Bueno, agradezco enormemente a mis directores, Juan Manuel Afonso y Ana Navarro. Juama, desde antes de conocernos y vernos las caras, desinteresadamente tú ya me estabas ayudando, sí, quizá ni te acuerdas, pero tú me ayudaste mucho para arreglar mis papeles de la beca chilena antes de venirme...eres una bellísima persona, un profesional excelente, ¡trabajador como tú solo! y te agradezco por haberme dado la oportunidad de aprender de mejora genética en tu grupo y en tu proyecto estrella...me siento muy agradecida y afortunada de haber sido una de tus becarias...¡gracias por todo tu apoyo, confianza y conocimiento!...

Ana, ¡eres una súper jefa!...¡tu apoyo ha sido incalculable!, ¡Millones de gracias!. Siempre me he sentido muy cómoda y segura trabajando contigo, gracias por tus conocimientos ¡eres muy generosa!...te estaré eternamente agradecida por todo lo que me has enseñado, por tu apoyo, por tu tiempo, tus consejos, tu buen rollo, tu paciencia, tu optimismo, que muchas veces me subió el ánimo en los momentos complicados...sé que llegarás lejos en tu carrera científica porque tienes una gran calidad como persona y como investigadora...te extrañaré un montón, enserio...en especial cuando tenga que organizar un muestreo, escribir un informe o un artículo, o ¡diseñar una camiseta!, jaja... eso sí he aprendido a optimizar ¡como no lo veas! y a escribir protocolos, ¡ufff!, ¡eso te lo puedo asegurar!...

A mis compañer@s de laboratorio, Davinia gracias por tu apoyo, mucho de tu trabajo está en esta tesis también, gracias por tu claridad, orden, sinceridad y alegría, ¡suerte en tu tesis!. Guaci aunque ya no estás, agradezco tu guía en mis primeros días de laboratorio, también tus extracciones, el apoyo en los muestreos, tu preocupación por los detalles y tu simpatía, sin esto se habría hecho mucho más pesado el trabajo. Sara, elegiste otro camino, pero estoy segura que te irá excelente y eso te hará feliz, gracias por la amistad y por tu actitud relajada, que me ayudaba a relajarme también. Vanessa te agradezco que siempre tuvieras un momento para conversar de la vida y dar algún consejo o buen dato. A Moha, Islam y Rodrigo (mi compatriota) por lo que me enseñaron en mis primeros tiempos en el laboratorio y por vuestra simpatía. A Manolita, gracias por tu buen rollo y por tu apoyo y gran disposición a colaborar. A Silvia ¡eres la mejor compañera para trabajar dando prácticas!. Y a Miguel por tu simpatía, suerte en tu tesis.

María Jesús, gracias por la preocupación por los detalles. En un inicio, cuando recién llegue tú fuiste un gran apoyo, ese apoyo con aire maternal que lo tienes a flor de piel, y lo das quizá sin darte cuenta, gracias por darnos a los foráneos ese ambiente de hogar acogedor que extrañamos en la vida laboral y en estas lejanas tierras.

A mis amigos que se han marchado pero que quedan en mi corazón, a Fatima Zhara, amiga gracias por tu amistad cuando más la necesité, que Dios te bendiga y logres tus sueños!, a Rachid, Eyad y Julud.

A mis compañeros del doctorado, máster y de la nave, Ada, Desy, Lorena, Rubén (¡tienes que visitar Chile!), Dailos, Mónica, Juan Pulpo, Fran, Fefi, Reda, Silvia, Alex, Cristina, Lahusine, Tibi, Gerson, Laura, Mauricio. A todos los colegas del IUSA, Carmen, Yure, Pedro, Silvia, Fátima, Bruno, Lorena, Orestes, Judith, Lita. Al personal del ICCM, a Miguel, Martín, Cristina, Gerardo, Juan de mantenimiento, Tere, María, Kike y a tantos otros que ahora puede que se me escapen, ¡muchas gracias!

A los Seniors del GIA, gracias Pipo, Dani, Javi por todo lo que me enseñaste en el Mesocosmos, Lucía, Rafa por tu gran disposición a ayudarnos con los papeleos para las becas, Juan, Carmen Mari, Mapi y Marisol.

A mis amigos en la fé, ¡gracias Sarai!, ¡eres un ángel!, a tus padres Maruchi y Armando, a Ruth y Maggi, gracias por los ricos almuerzos sabatinos acompañados de esas largas tertulias, que nos ayudaron mucho a sentirnos acogidos cuando llegamos. Maribel jefa, ¡gracias! tú sabiduría es enorme. A Herminia, Yaiza y Aron. A Alberto y Dámaris por el gran apoyo siempre en especial cuando recién llegamos. Para qué decir lo agradecida que estoy de ti Tomás, que Dios te bendiga y a Alida también. Gracias Saida y Samuel, por vuestra gran simpatía y amistad. Gracias David y Noemi, por esos momentos navideños en vuestra casa. Gracias José Luis y María Jesús, por los datos de medicina natural para sanar a mi peque. A José Ángel y Juanita por su sencillez y simpatía. A Maricarmen y Paca por apoyarnos con nuestro pequeño que Dios las bendiga. Agradezco a los jóvenes Israel, Elais, Carolina, Joel, María, Raquel, Elena, Joni, Rosana, Miriam, Cristina, Alexis, Gica, Santiago, Maribel, por los buenos momentos. Gracias Rosy y Miguel Ángel por todos los detalles. Isaí, Pino y Loida, por su gran hospitalidad y alegría. Sonia, Isabel y Cista, que Dios las bendiga y a sus familias. Ana, la venezolana y a Pedro el cubano, los extrañaremos mucho, que Dios les dé lo que necesitan y mucho más. A Víctor y Noralba gracias por su hermosa y rica invitación. A Carmen y Raúl, Jorge y Ángela. A Conchi, a Aide, Maribel y Guillermo y toda su gran familia, a Elias y Angeles, Ciro y Taida. A Desire y a toda su familia, gracias por su cariño y ricas invitaciones. La lista es larga, a todos muchas gracias y siempre tendrán un lugar en mi corazón.

Por último agradezco enormemente al programa de la Comisión Nacional de Investigación y Tecnología de Chile (CONYCI) que dirige el Programa de Becas Chile, por otorgarme la oportunidad de desarrollar este estudio en el extranjero, por el financiamiento y apoyo en otros aspectos de nuestro quehacer como becarios. Y también agradezco muy sinceramente a la Universidad Santo Tomás de Chile, por el gran apoyo, espaldarazo y confianza que depositaron en mí al darme financiamiento y permiso laboral para desarrollar esta tesis doctoral aquí en Las Palmas, espero no defraudarlos y que se vea grandemente recompensado su inversión cuando regrese a Chile.

De todos ustedes, me siento eternamente agradecida, ya saben, si falta alguien por favor discúlpeme, no es mi intención, hagan cuenta que también están, en especial en mi corazón...y demás está decir que el que quiera ir para Chile, ¡allí le esperamos con los brazos abiertos!...¡¡sólo tienen que avisar!!

FUENTES DE FINANCIACIÓN

El presente trabajo se desarrolló en el marco del proyecto titulado “**Desarrollo de un Programa Piloto de Mejora Genética en Dorada (*Sparus aurata L.*), PROGENSA®**”, financiado por el **Ministerio de Medio Ambiente, Rural y Marino (MARM) a través de la Secretaría General del Mar y la Junta Nacional Asesora de Cultivos Marinos (JACUMAR) de España**. En este proyecto participaron cuatro instituciones españolas: la Universidad de las Palmas de Gran Canaria y el Instituto Canario de Ciencias Marinas cuyo responsable fue el Dr. Juan Manuel Afonso López (coordinador); el Institut De Recerca I Tecnologia Agroalimentàries, de Cataluña cuyo responsable fue la Dra. Alicia Estévez García; el Instituto de Investigación y Formación Agraria y Pesquera del El Toruño, Andalucía, cuyo responsable fue el Dr. Manuel Manchado Campaña y la Universidad de Murcia y el Instituto Murciano de Investigación y Desarrollo Agrario y Alimentario cuyo responsable fue el Dr. Manuel Guillermo Ramis Vidal. El proyecto se llevó a cabo en conjunción con la industria, por lo que también participaron diferentes empresas de cría y engorde de dorada como son Culmasur S.A., Piscimar S.L., Canexmar S.L., Servicios Atuneros del Mediterráneo S.L., PIM S.A. y Cultimar S.A.

Este trabajo ha sido también financiado por **dos becas concedidas a Ivonne Lee Montero para desarrollar esta tesis doctoral**:

1. Beca Presidente de la República, Programa de Formación de Capital Humano Avanzado, concedida por el Gobierno de Chile para estudios de doctorado.
2. Beca de Perfeccionamiento Académico para Estudios en el Extranjero concedida por la Universidad Santo Tomás de Chile.

RESUMEN	1
1. INTRODUCCIÓN GENERAL	5
1.1. ANTECEDENTES BIOLÓGICOS DE DORADA	7
1.1.1. Taxonomía	7
1.1.2. Distribución y Hábitat	7
1.1.3. Anatomía	8
1.1.4. Alimentación y Reproducción	8
1.2. SITUACIÓN ACTUAL DEL CULTIVO DE DORADA	9
1.3. ANTECEDENTES SOBRE MEJORA GENÉTICA EN ACUICULTURA	12
1.3.1. Antecedentes de Mejora Genética en Dorada	12
1.3.2. ¿Qué se necesita saber para implementar un Programa de Mejora Genética en Dorada?	13
1.3.2.1. Población base	14
1.3.2.2. Matriz de parentesco	14
1.3.3. Caracteres Productivos de Interés para la Mejora Genética	17
1.3.4. Interacción Genotipo-Ambiente	19
1.3.5. Evaluación Genética y Reposición	21
1.4. OBJETIVOS	23
2. DESARROLLO DEL PRIMER PANEL ESTANDARIZADO DE DOS NUEVAS PCRS MÚLTIPLEX DE MARCADORES MICROSATÉLITES EN DORADA (<i>Sparus aurata</i> L.)	25
2.1. INTRODUCCIÓN	27
2.2. MATERIALES Y MÉTODOS	30
2.2.1. Muestras	30
2.2.2. Evaluación de los Marcadores Microsatélites	30
2.2.2.1. Diseño de los Cebadores	30
2.2.2.2. Reacción PCR	31
2.2.2.3. Facilidad de Lectura	31
2.2.3. Optimización de las PCRs Súper Múltiplex	33
2.2.4. Genotipado y Asignación Familiar	35
2.2.5. Análisis de Datos	35
2.3. RESULTADOS	36
2.3.1. Evaluación de los Marcadores Microsatélites	36

2.3.2. Optimización de las PCRs Súper Múltiplex	36
2.3.3. Genotipado y Asignación Familiar	40
2.4. DISCUSIÓN	41
2.4.1. Evaluación de Marcadores Microsatélites	41
2.4.2. Optimización de las PCRs Súper Múltiplex	42
3. ESTIMACIÓN DE PARÁMETROS GENÉTICOS DE CARACTERES DE CRECIMIENTO Y CALIDAD E INTERACCIÓN GENOTIPO-AMBIENTE EN DORADA (<i>Sparus aurata</i> L.)	47
3.1. INTRODUCCIÓN	49
3.2. MATERIALES Y MÉTODOS	55
3.2.1. Material Biológico	55
3.2.2. Muestreos	57
3.2.3. Asignación Parental	62
3.2.4. Análisis de Datos	62
3.3. RESULTADOS	64
3.3.1. Genotipado y Asignación de Paternidad	64
3.3.2. Resultados Fenotípicos	65
3.3.2.1. Crecimiento y Deformidad	65
3.3.2.2. Caracteres de la Canal (peso canal, peso filete, rendimiento canal, rendimiento filete, grasa visceral y porcentaje de grasa visceral)	66
3.3.2.3. Caracteres Morfológicos a través de Análisis de Imágenes	67
3.3.2.4. Caracteres de Composición de la Carne	68
3.3.3. Heredabilidades y Correlaciones	68
3.3.3.1. Crecimiento y Deformidad	68
3.3.3.2. Caracteres de la Canal y Morfológicos con Análisis de Imágenes	71
3.3.3.3. Caracteres de Composición de la Carne	73
3.3.4. Interacción Genotipo-Ambiente	74
3.3.4.1. Interacción Genotipo-Ambiente para Variables de Crecimiento y Deformidad	74
3.3.4.2. Interacción Genotipo-Ambiente para Caracteres de la Canal y de Composición de la Carne	75
3.4. DISCUSIÓN	76
3.4.1. Genotipado y Asignación de Paternidad	76
3.4.2. Resultados Fenotípicos	77

3.4.2.1. Crecimiento y Deformidad	77
3.4.2.2. Caracteres de la Canal, Morfológicos con Análisis de Imágenes y de Composición de la Carne	80
3.4.3. Heredabilidades y Correlaciones	83
3.4.3.1. Crecimiento y Deformidad	83
3.4.3.2. Caracteres de la Canal, Morfológicos con Análisis de Imágenes y de Composición de la Carne	87
3.4.4. Interacción Genotipo-Ambiente	94
4. CONCLUSIONES	97
5. BIBLIOGRAFÍA	101
ANEXO I - ARTÍCULO Lee - Montero <i>et al.</i> (en prensa)	119

Figura 1.1 Visión lateral de una dorada adulta.	8
Figura 1.2 Evolución de la producción de dorada en Europa y en el Mediterráneo para el período 1985-2011 (APROMAR, 2012).	9
Figura 1.3 Distribución porcentual de la producción de dorada en el área mediterránea y el resto del mundo en 2011 (APROMAR, 2012).	10
Figura 1.4 Producción de dorada en España 2002-2011 (Elaboración propia a partir de datos de FEAP, 2012).	10
Figura 1.5 Distribución porcentual de la producción de dorada por comunidad autónoma en 2011 (APROMAR, 2012).	11
Figura 1.6 Distribución de incidencia de deformidades esqueléticas por sistema de cultivo en dorada (Roo <i>et al.</i> , 2005). LSK: triple deformidad (lordosis, escoliosis, cifosis) (Afonso <i>et al.</i> , 2000).	21
Figura 2.1 Tipos de errores potenciales de genotipado durante el proceso de determinación y redondeado de los alelos del <i>GremmProtocol</i> ; a) <i>amplificación inadecuada</i> , b) <i>pérdida de un alelo</i> , c) <i>patrón de bandas confuso</i> , d) <i>alelos intermedios</i> .	32
Figura 2.2 Variabilidad genética de los marcadores adecuados de este estudio (<i>Radal</i>), ordenados de acuerdo a su rango alélico y etiquetados en el siguiente orden: Nombre (código interno) – Grupo de Ligamiento - Motivo nucleotídico - Número de alelos - Heterocigosidad observada - Heterocigosidad esperada – Contenido de información Polimórfica.	38
Figura 3.1 Esquema de integración de la mejora genética en el tejido industrial de dorada (PROGENSA®)	56
Figura 3.2 Medidas realizadas en dorada como pez entero. A) El círculo muestra posición del émbolo en la medida de la fuerza máxima con el texturómetro; B) Los rectángulos muestran las dos posiciones de las medidas realizadas en cada cara del pez con el <i>Fish Fatmeter</i> ; C) La línea negra muestra el contorno del área del filete obtenido en cada pez.	59
Figura 3.3 Caracteres de análisis de imagen, realizadas por el programa automatizado para imágenes de dorada. A) Vista Lateral: x1, x2, x3, x4, x5, x6 puntos del eje longitudinal; a, b, c, d, e son medias estandarizadas de alto; y1, y2, y3, y4 son ejes dirección vientre-lomo; B) Vista Dorsal: x1, x7 puntos del eje longitudinal; a, b, c, d, e son medidas estandarizadas de anchos; z1 eje de ancho.	61
Figura 3.4 Peso medio de las familias representadas en las cinco estaciones estudiadas	74

Tabla 1.1 Estudios de variabilidad genética en dorada y otras especies de cultivo de interés comercial, mediante marcadores microsatélites.	15
Tabla 2.1 <i>Radal</i> : Listado de marcadores microsatélites seleccionados como adecuados en este estudio: código interno (CI), nombres de los <i>loci</i> , número de acceso al GenBank, fluorocromos y secuencias de los cebadores.	34
Tabla 2.2 La información genética de las Súper Múltiplex optimizadas para dorada (SMsa1 y SMsa2): Código interno, fluorocromo, grupo de ligamiento, motivo nucleotídico, concentración de cebadores, rango alélico (en pares de bases), número de alelos, heterocigosidad observada y esperada, contenido de información polimórfica y genotipo de la muestra de referencia (Ref-sa) para cada uno de los marcadores microsatélites.	37
Tabla 3.1 Número de reproductores que contribuyeron, junto a las familias de hermanos completos y medios hermanos por comunidad autónoma.	64
Tabla 3.2 Peso, longitud furcal, factor de condición (media \pm error típico) y prevalencia de deformidades (%) de columna vertebral, cabeza, opérculo y total, a diferentes edades y estaciones de cría y engorde, en dorada.	66
Tabla 3.3 Variables de la canal (peso canal, peso filete, grasa visceral, rendimiento canal, rendimiento filete, porcentaje de grasa visceral (media \pm error típico) a edad de sacrificio para dorada, por estación, considerando los datos de los peces engordados en Canarias.	66
Tabla 3.4 Variables morfológicas de análisis de imágenes (media \pm error típico) a edad de sacrificio en los peces engordados en Canarias, por estación.	67
Tabla 3.5 Variables de calidad (media \pm error típico) a edad de sacrificio en Canarias, por estación: composición de la carne: colágeno, humedad, proteína, lípidos y <i>Fish Fatmeter</i> (FF) y fuerza máxima como variable de textura.	68
Tabla 3.6 Heredabilidades (en la diagonal y en negrita, con \pm error típico), correlaciones genéticas (en cursiva encima de la diagonal, con \pm error típico) y correlaciones fenotípicas (debajo de la diagonal) entre peso, longitud (Long), compacidad (FC) y deformidad (Def) a diferentes edades (días post eclosión) a partir de los datos de los peces criados en Canarias.	69
Tabla 3.7 Heredabilidades (con \pm error típico) para cada tipo de deformidades de dorada estimadas en diferentes edades considerando sólo los datos de Canarias (ICCM y CANEXMAR).	70
Tabla 3.8. Heredabilidades (en la diagonal y en negrita, con \pm error típico), correlaciones genéticas (en cursiva encima de la diagonal, con \pm error típico) y correlaciones fenotípicas (debajo de la diagonal) entre peso, longitud (Long), compacidad (FC) y deformidad (Def) para dorada a 689 dpe estimadas a partir de los datos de los peces engordados en cinco estaciones (ICCM, CANEXMAR, PIMSA, CULTIMAR Y SERVICIOS ATUNEROS DEL MEDITERRÁNEO).	70
Tabla 3.9 Heredabilidades (en la diagonal y en negrita, con \pm error típico), correlaciones genéticas (en cursiva encima de la diagonal, con \pm error típico) y correlaciones fenotípicas (debajo de la diagonal) entre variables de crecimiento, calidad de la canal, tipo de deformidades y variables morfológicas analizadas por análisis de imágenes para dorada a edad de sacrificio, estimadas en los peces engordados en Canarias. Longitud furcal (Long), Factor de condición (FC), Peso canal (PC), peso filete (PF), rendimiento canal (%canal), rendimiento filete (%filete), porcentaje de grasa visceral (%GV), deformidad de columna (Def Col), de cabeza (Def Ca) y total (Def Tot), longitud furcal	

(LF), área total lateral (ATL), alto máximo (AIM), área total dorsal (ATD), ancho máximo (AnM), área filete (AF), volumen filete (VF), longitud sin cola (LSC), alto cabeza (AlCa), excentricidad cabeza(ExCa) y excentricidad pez (ExP)	72
Tabla 3.10 Heredabilidades (en la diagonal y en negrita, con \pm error típico), correlaciones genéticas (en cursiva encima de la diagonal, con \pm error típico) y correlaciones fenotípicas (debajo de la diagonal) entre variables de longitud (Long), rendimiento canal (% Canal), rendimiento filete (% Filete), porcentaje de grasa visceral (%GV), <i>Fish Fatmeter</i> (FF), colágeno, lípidos, humedad, proteína, fuerza máxima (F Máx.), a edad de sacrificio (689 dpe), a partir de los datos de los peces engordados en Canarias.	73
Tabla 3.11 Interacción genotipo-ambiente para caracteres de crecimiento y deformidades a talla de sacrificio entre las cuatro comunidades.	74
Tabla 3.12 Interacción genotipo-ambiente para cada carácter, en dorada a talla sacrificio (689 dpe) a través de correlaciones genéticas entre las dos estaciones (\pm error típico).	75

En este estudio, se ha protocolizado la metodología que permite la integración de la selección genética bajo los condicionantes propios del sistema de producción de dorada (*Sparus aurata* L.) poniéndola en práctica a nivel nacional en colaboración con seis empresas españolas. Se criaron peces descendientes de tres lotes industriales (ICCM: Canarias, CULMASUR S.A.: Andalucía, PISCIMAR S.L.: Valencia), marcados con *Passive Integrated Transponder* (PIT) y mezclados, en las instalaciones de cuatro centros de investigación y cuatro empresas (ICCM y CANEXMAR S.L.: Canarias; IFAPA y PIM S.A.: Andalucía; IRTA y CULTIMAR S.A.: Cataluña; IMIDA y SERVICIOS ATUNEROS DEL MEDITERRÁNEO: Murcia). Se realizaron muestreos de crecimiento de manera simultánea en las cuatro comunidades autónomas (179, 269, 389 y 539 días), además de un muestreo final de sacrificio (689 días) a talla ración donde se valoraron nuevas e importantes variables fenotípicas, tras unificar criterios.

Para la determinación de las relaciones parentales-filiales se pusieron a punto nuevas PCRs múltiplex con marcadores microsatélites del mapa de dorada.

Se diseñaron 138 nuevos juegos de cebadores a partir del mapa genético de dorada, con la misma temperatura de hibridación para poder ser combinados en PCRs múltiplex. En los laboratorios de las cuatro comunidades autónomas se genotiparon 16 muestras no relacionadas de dorada para evaluar la variabilidad genética y la facilidad de lectura de todos estos microsatélites, estableciendo antes una normalización para clasificar los errores de genotipado y valorar los microsatélites (*GremmProtocol*). A partir de los mejores marcadores (*Radial*) se establecieron 2 nuevas y robustas reacciones de PCR múltiplex, de 11 microsatélites cada una, llamadas SMSa1 y SMSa2, teniendo en cuenta no repetir el grupo de ligamiento y que no se solaparan los amplicones por su color del fluorocromo y rango alélico. Ambas PCRs múltiplex se han propuesto como el primer panel de referencia de marcadores microsatélites en dorada.

Usando sólo la SMSa1 se genotiparon todos los reproductores y sus descendientes y se determinaron con éxito las relaciones parentales-filiales. Todos los descendientes procedentes del lote de Canarias y de Cataluña, se asignaron cada uno a una pareja de padres. En los descendientes del lote de Andalucía los resultados fueron igualmente satisfactorios excepto que el 20% era asignado a 2 parejas posibles, debido a que dos reproductores eran casi idénticos genéticamente.

Se evaluó la contribución a través de puestas masales controladas a partir de todos los peces analizados. Los mayores valores se obtuvieron en el lote de Canarias (83%), que es de hecho el más utilizado por la empresa, y el mayor número de familias se obtuvo en el lote de Andalucía (193 familias de hermanos carnales), si bien este lote era el más numeroso. De manera general, la contribución media

fue muy buena (68%) y se formaron un total de 297 familias de hermanos carnales con un número de descendientes medio de 17,7, más 53 familias de medios hermanos maternos y 52 de medios hermanos paternos.

A partir de los peces engordados en Canarias, se estimaron parámetros genéticos (heredabilidades y correlaciones genéticas y fenotípicas) para caracteres de crecimiento y deformidad a distintas edades, y para caracteres de rendimiento, morfología y calidad de la carne a talla de ración. Y a partir de los peces criados en las cuatro comunidades autónomas se estimaron parámetros genéticos de crecimiento y deformidad al sacrificio. Todo esto con el fin de proporcionar al sector industrial información que le permita tomar decisiones con criterio genético para explotar la rentabilidad de sus poblaciones sin modificar sustancialmente su sistema de producción.

Las heredabilidades a distintas edades para caracteres de crecimiento presentaron valores medios ($0,16 \pm 0,05$ – $0,48 \pm 0,10$), en general aumentando cuanto más cerca de la edad de sacrificio. En cuanto a las correlaciones genéticas, las estimadas entre el peso y la longitud en cada edad fueron altas y positivas ($>0,94$), como era de esperar. La compacidad con el peso y la longitud presentó valores desde bajas hasta altas ($0,10 \pm 0,21$ – $0,85 \pm 0,11$). La presencia-ausencia de todo tipo de deformidades, carácter muy importante económicamente para la industria, presentó heredabilidades entre $0,07 \pm 0,03$ y $0,26 \pm 0,06$ a las distintas edades. También se estimaron las heredabilidades según el tipo de deformidad, siendo la de columna la que presentó, a la edad de sacrificio, el mayor valor ($0,16 \pm 0,06$). En cuanto a las correlaciones genéticas éstas fueron medias y positivas con los caracteres de crecimiento. A la edad de sacrificio, las heredabilidades fueron de $0,43 \pm 0,10$ para peso, $0,40 \pm 0,09$ para longitud y de $0,20 \pm 0,05$ para la compacidad. En cuanto a los caracteres de rendimiento y calidad, las heredabilidades para las variables de rendimiento mostraron estimas bajas, cuando fueron consideradas como porcentajes, y medias, en valor absoluto. Las correlaciones genéticas del peso canal y peso filete con los caracteres de crecimiento fueron altas y positivas, mientras que las mismas para el porcentaje canal y porcentaje filete fueron, en general, bajas y las de la grasa visceral fueron medias-altas. Aunque el porcentaje canal no presentó casi heredabilidad, su alta y negativa correlación genética con el porcentaje de grasa visceral sugiere que se podría mejorar por esta vía. Las heredabilidades de las variables morfológicas, las cuales fueron obtenidas a través de análisis de imágenes, utilizando una nueva aplicación *IMAFISH_ML*, estuvieron entre $0,17 \pm 0,05$ y $0,51 \pm 0,10$. En general, presentaron correlaciones altas con caracteres de crecimiento y rendimiento filete y medias con caracteres de deformidad. En concreto, el carácter *AICa* (alto de cabeza) mostró la mayor heredabilidad, lo que lo predispone como un criterio de selección eficaz y no invasivo para mejorar indirectamente los caracteres de crecimiento y algunos de rendimiento. Las heredabilidades de las variables de calidad de la carne mostraron valores entre $0,01 \pm 0,01$ y $0,45 \pm 0,11$. Los lípidos y la humedad presentaron heredabilidad baja-media, mientras que no presentaron determinación genética aditiva el colágeno y la proteína. Todos estos caracteres mostraron

correlaciones genéticas favorables con el crecimiento. El *Fish Fatmeter* (FF) presentó una correlación genética con el porcentaje de lípidos muscular de $0,99\pm 0,05$ e incluso una heredabilidad mayor que éste, lo que lo revela como un método eficaz de medida de lípidos musculares y un buen criterio de selección para este carácter. La fuerza máxima, un parámetro de textura, presentó una heredabilidad de $0,17\pm 0,05$. Es importante destacar que en este estudio se analizaron variables para las cuales nunca antes se habían estimado parámetros genéticos en dorada, como las variables de morfología a través del análisis de imágenes, el FF y la textura.

Se estimó la interacción genotipo-ambiente, entre las cinco estaciones para el crecimiento y deformidad y entre el ICCM y CANEXMAR para todos los caracteres analizados. Las correlaciones genéticas, fueron en general altas y positivas en todas las variables que presentaron heredabilidad distintas de cero, indicando la ausencia de interacción genotipo-ambiente entre sistemas de engorde y comunidades autónomas.

Todos estos resultados revelan el potencial que tienen las empresas de dorada para mejorar su producción a través de la explotación de la variación genética aditiva, y demuestra que es posible implementar un programa de mejora genética en dorada, sin cambiar la idiosincrasia de la industria. Además la no existencia de interacción genotipo-ambiente sugiere que las empresas podrían exportar sus producciones mejoradas genéticamente entre comunidades y por último señalar que estos desarrollos constituyen en sí mismos transferencia de conocimiento, ya que han sido realizados con las propias empresas del sector.



1. INTRODUCCIÓN GENERAL

1.1 ANTECEDENTES BIOLÓGICOS DE DORADA

Existen numerosos estudios sobre dorada (*Sparus aurata*, Linnaeus, 1758) a raíz del interés económico que supone su cultivo. A continuación se entregará información básica relacionada con los aspectos generales que caracterizan a la especie.

1.1.1 Taxonomía

La dorada es una especie marina, perteneciente a la familia de los espáridos y al género *Sparus*. Su clasificación taxonómica es la siguiente:

Reino	:	Animal
Phylum	:	Chordata
Subphylum	:	Gnathostomata
Clase	:	Actinopterygii
Subclase	:	Teleostei
Superorden	:	Neognathi
Orden	:	Perciformes
Familia	:	Sparidae
Género	:	<i>Sparus</i>
Especie	:	<i>Sparus aurata</i>

Sus nombres vernaculares en los distintos idiomas son los siguientes:

Español	:	Dorada
Inglés	:	Gilthead seabream
Francés	:	Dorade
Alemán	:	Goldbrasse
Italiano	:	Orata

1.1.2 Distribución y Hábitat

Se distribuye a través de 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, desovan en el mar en invierno y posteriormente los juveniles migran a principios de primavera en busca de lugares más protegidos, con abundancia de comida y con temperaturas medias. Regresando a mar abierto a finales de otoño para reproducirse (Moretti *et al.*, 1999).

1.1.3 Anatomía

La dorada 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 1.1).



Figura 1.1 Visión lateral de una dorada adulta

1.1.4 Alimentación y Reproducción

En lo referente a su dieta natural, es preferentemente carnívora, depredadora de especies de fondo (bivalvos y gasterópodos), 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·kg⁻¹ de hembra (Cejas *et al.*, 1992).

El desove 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 2010 se produjeron sólo 10,6 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 78,9 millones de toneladas en 2010, con un valor comercial que sobrepasó los 100 millones de euros (APROMAR, 2012).

La dorada, junto a la lubina (*Dicentrarchus labrax*), el rodaballo (*Psetta máxima*) y la corvina (*Argyrosomus regius*) son las especies más relevantes de peces marinos de cultivo producidos en los países europeos meridionales.

La producción acuícola de dorada en el mundo ha sido de 151.346 toneladas en el año 2011, un 2,9% inferior al año anterior, siendo su máximo el 2008 con 178.554 toneladas, explicándose esta situación a desequilibrios sectoriales y la crisis en el entorno económico y financiero, especialmente en Grecia (Figura 1.2).

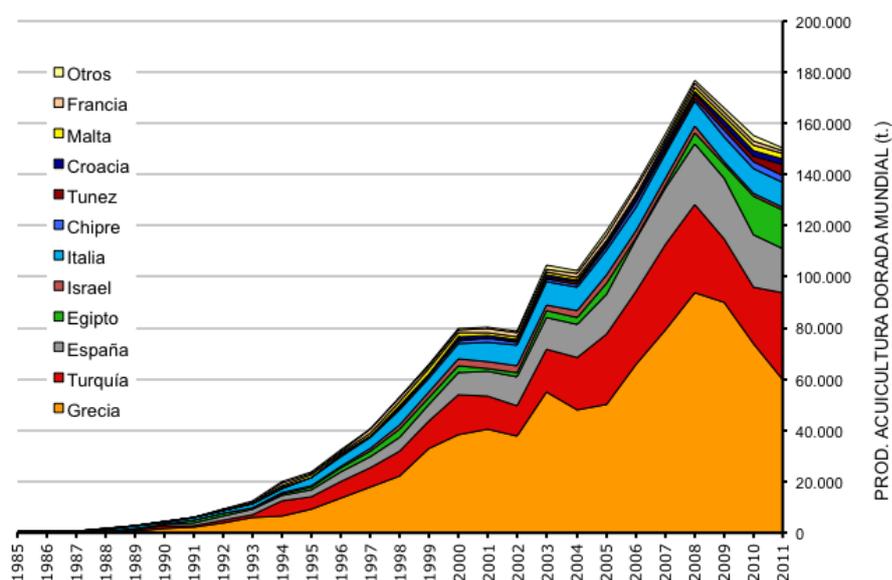


Figura 1.2 Evolución de la producción de dorada en Europa y en el Mediterráneo para el período 1985-2011 (APROMAR, 2012).

La producción de dorada se realiza en 19 países siendo sus principales productores Grecia con 60.000 toneladas representando el 39,6% del total, seguido por Turquía con 34.000 toneladas (22,5%) y España con 16.930 toneladas (11,2%) (Figura 1.3).

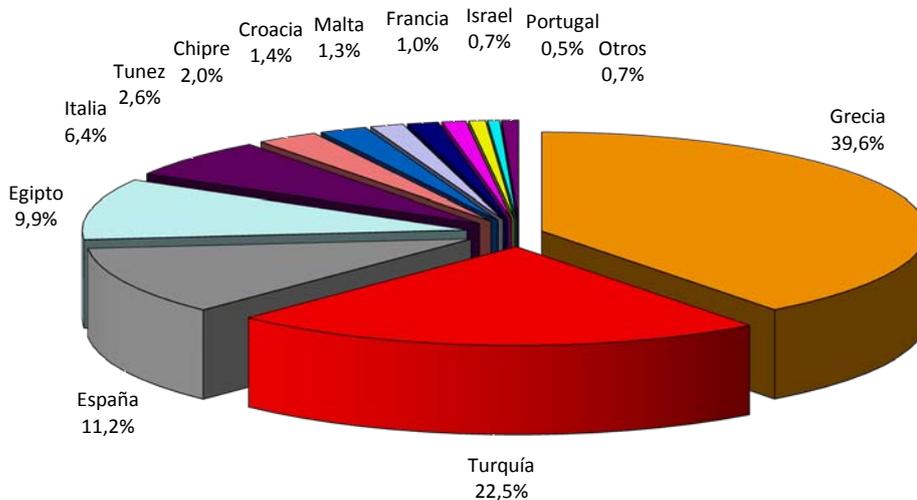


Figura 1.3 Distribución porcentual de la producción de dorada en el área mediterránea y el resto del mundo en 2011 (APROMAR, 2012).

En lo que ha pesca extractiva de dorada se refiere, su volumen a medio plazo ha permanecido constante entre las 7.000 y 8.500 toneladas anuales, representando sólo el 5,6% del total.

La producción de dorada de acuicultura en España llevaba un ritmo de crecimiento constante desde las 11.355 toneladas en 2002, hasta el año 2009 donde alcanzó su máximo de producción con 23.960 toneladas, desde las 11.355 en 2002, para luego decrecer un 15% y un 16,8% en 2010 y 2011 respectivamente, retornando este último año a cifras que ya se habían alcanzado en el año 2005 (Figura 1.4).

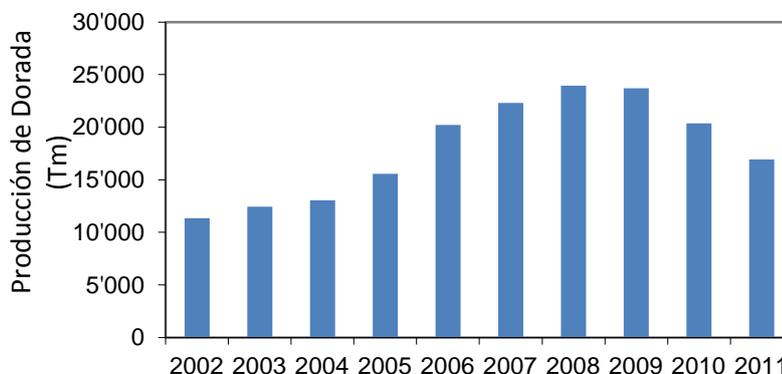


Figura 1.4 Producción de dorada en España 2002-2011 (Elaboración propia a partir de datos de FEAP, 2012).

La producción de dorada por las comunidades autónomas en el 2011 está encabezada por la comunidad Valenciana con un 40,8%, seguido por Murcia y Canarias con un 20,5% y un 19,2% respectivamente (Figura 1.5).

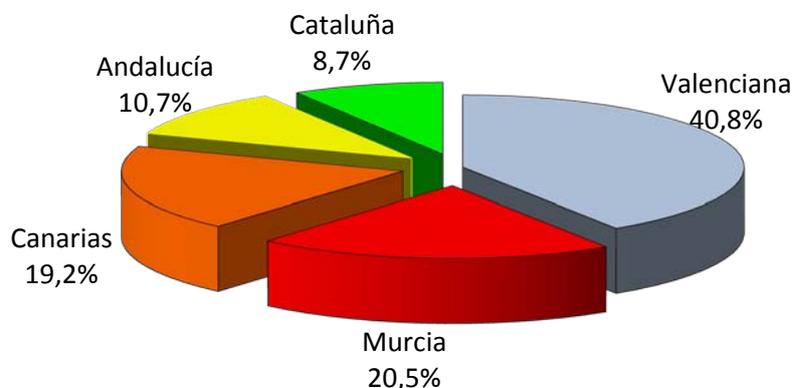


Figura 1.5 Distribución porcentual de la producción de dorada por comunidad autónoma en 2011 (APROMAR, 2012).

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).

El precio medio de primera venta de dorada de acuicultura producida en España en 2011 ha sido de 5,00 €·kg⁻¹, cifra que es un 19% mayor a la de 2010, lo que se explica por la menor oferta de dorada en Grecia, Turquía y España, repercutiendo positivamente en la rentabilidad de los productores dado que los costes de producción fluctúan entre 3,8 y 4,3 €·kg⁻¹ (APROMAR, 2012).

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 ANTECEDENTES SOBRE MEJORA GENÉTICA EN ACUICULTURA

La mejora genética animal es una ciencia que se aplica para encontrar estrategias óptimas para aprovechar la variación genética existente en una especie en particular, incrementar su bienestar, su productividad y mejorar la calidad del producto (Gjedrem, 2005). La aplicación de esta ciencia en animales terrestres y en plantas ha hecho una contribución sustancial en el incremento de la productividad y la viabilidad de las industrias productoras de alimento (Ponzoni *et al.*, 2007; Neira, 2010; Gjedrem *et al.*, 2012). En general, la inversión en el establecimiento de programas de mejora genética puede proveer de una alta tasa de retorno económico, pues la ganancia genética en el tiempo es acumulativa, permanente y sustentable (Ponzoni *et al.*, 2008). Sin embargo, en comparación con animales de granja, la aplicación de los principios de la genética cuantitativa en peces ha sido muy reciente (Gjedrem, 2005). A pesar de que en general, la respuesta a la selección es usualmente más alta en peces y moluscos que en animales de granja (Olesen *et al.*, 2003) y que el potencial para mayores ganancias genéticas está bien documentado, el desarrollo de programas de mejora ha progresado lentamente (Neira 2010; Rye *et al.*, 2010; Gjedrem *et al.*, 2012). Se estima que menos del 10% de la producción acuícola mundial en la actualidad está basada en stocks mejorados genéticamente.

1.3.1 Antecedentes de mejora genética en Dorada

Actualmente, la intervención genética sobre la producción de dorada, al igual que en otras especies de acuicultura, está muy poco extendida. En cambio se han llevado a cabo distintas actuaciones alrededor de la alimentación, del manejo de los lotes, de la prevención de enfermedades e incluso de la ubicación de sus instalaciones. Las razones son en parte, debido a la falta de personal especializado, 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 sus correlaciones genéticas y a la falta de metodología que conjugue los intereses de producción con la explotación de la variación genética de ésta. Aunque a nivel empresarial existen algunos programas de mejora genética en esta especie (Rye *et al.*, 2010), son pocos los parámetros genéticos que han sido publicados, y menos aún los que se han estimado bajo condiciones industriales.

Knibb *et al.* (1997) estimaron una heredabilidad realizada para el peso al sacrificio, a partir de la respuesta a una selección masal después de una generación. Montero *et al.* (2001) obtuvieron una heredabilidad no distinta de cero, a escala experimental, para el nivel de cortisol plasmático post-estrés de confinamiento. Afonso *et al.* (2000) describieron inicialmente una asociación familiar estadísticamente significativa para una triple deformidad de columna en sentido antero-posterior, mediante cruces dirigidos. Posteriormente, Astorga *et al.* (2004) estudiaron 38 tipos de deformidades

morfológicas que aparecieron en dicho esquema, simples o combinaciones de éstas, sobre un lote de 11038 descendientes no cribados provenientes de un lote de reproductores con control individual del apareamiento, estimando la heredabilidad para el carácter presencia-ausencia de cualquier tipo de deformidad. Thorland *et al.* (2006), en la empresa griega KEGO S.A., estimaron heredabilidades para el peso al sacrificio (250 a 400 g), el color de la piel valorada mediante una escala discreta y para la presencia-ausencia de la deformidad de cabeza y deformidades espinales. Castro *et al.* (2008) a escala experimental, no evidenciaron componente genético para las deformidades lordosis y opérculo. Navarro *et al.* (2009a, 2009b) estimaron heredabilidades bajo condiciones industriales, a partir de peces engordados en Canarias tanto en tanques como en jaulas insulares, para caracteres de crecimiento, de la canal y de composición de la carne a edad de cosecha. Estos autores trabajaron en una muestra de descendientes provenientes de un lote de reproductores del grupo industrial español Tinamenor S.A., a distintas edades de interés comercial (alevín, preengorde, primera maduración incipiente y talla de ración). Antonello *et al.* (2009) estimaron parámetros genéticos en dorada para caracteres crecimiento y de resistencia a la pasteurellosis.

Sin embargo, estos estudios han puesto 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, al igual que otras especies acuícolas con programas de mejora genética establecidos desde hace años y que han mostrados resultados óptimos (algunos de ellos con probadas estrategias de diseminación), como la carpa común (*Cyprinus carpio*), salmón del Atlántico (*Salmo salar*), trucha arcoiris (*Oncorhynchus mykiss*), tilapia del Nilo (*Oreochromis niloticus*), carpa asiática (*Labeo rohita*), camarón (*Litopenaeus vannamei*), o la ostra del Pacífico (*Crassostrea gigas*) (Gjedrem, 2012; Gjedrem *et al.*, 2012).

1.3.2 ¿Qué se necesita saber para implementar un Programa de Mejora Genética en Dorada?

Para hacer factible y atractiva la explotación de la variación genética aditiva de las poblaciones por parte de las empresas, es importante el entendimiento de los principales factores que lleva asociado el cultivo de dorada en condiciones industriales, tanto desde el punto de vista tecnológico como biológico, dentro del contexto de las fases que conlleva la aplicación de un programa de mejora genética, como son la variación de la población base, la determinación de la matriz de parentesco, la definición de los caracteres objeto de la selección, la estima de parámetros genéticos, la cuantificación de la interacción genotipo-ambiente (GxA), la evaluación genética o la reposición.

1.3.2.1 Población base

La variación genética de la población de partida es de gran importancia para el desarrollo de un programa de mejora genética, en la medida en que la variación genética condiciona la respuesta a la selección a corto y largo plazo (Falconer y Mackay, 1996). En dorada, los únicos estudios que existen sobre caracterización genética de las poblaciones han sido llevados a cabo sobre marcadores neutros, fundamentalmente microsatélites, indicando que la variación genética de las poblaciones que poseen actualmente las empresas y los centros de investigación de dorada es muy alta. En este sentido, Batargias *et al.* (1997, 1999), determinaron una heterocigosidad observada promedio de 0,875 en una población de cultivo, siendo una de la más alta en teleósteos. Alarcón *et al.* (2004) caracterizaron 11 poblaciones de dorada del océano Atlántico y del mar Mediterráneo, 6 naturales y 5 de cultivo, mediante el análisis de 11 marcadores isoenzimáticos y 3 microsatélites, no encontrando diferenciación genética entre ellas. Los niveles de heterocigosidad esperada registrados en poblaciones naturales y de cultivo fueron estadísticamente iguales, 0,864 y 0,845 respectivamente. De Innocentiis *et al.* (2005), con cuatro marcadores específicos de dorada (Batargias *et al.*, 1997) estimaron unas heterocigosidades observadas de 0,74 y 0,79 en dos poblaciones de cultivo pertenecientes a dos empresas italianas. De la misma forma, Blanco *et al.* (2007) y Borrell *et al.* (2007), caracterizaron una población de cultivo de dorada mediante el uso de 11 microsatélites, 6 específicos de dorada y 5 de besugo (*Pagellus bogaraveo*) (Piñera *et al.*, 2006), encontrando una heterocigosidad observada de 0,85 en la población de hembras y de 0,71 en la población de machos. Todos estos valores altos de heterocigosidad media ponen de relieve la falta de presión de selección a la que han sido sometidas las poblaciones de dorada, a la vez que la potencialidad genética de las mismas, cuando son comparadas con las descritas para otras especies de interés comercial (Tabla 1.1) y para las que existen programa de selección de notable éxito.

1.3.2.2 Matriz de parentesco

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 ha presentado inconvenientes debido a que aumenta 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 las puestas masales constituyan la estrategia más extendida para garantizar las necesidades de mercado y costes de producción en las empresas. La dorada produce cantidades elevadas y variables de huevos por kilogramo de hembra y puesta, y que fluctúan entre 500.000 y 6.000.000 (Cejas *et al.*, 1992). A pesar de ello, la supervivencia es baja en condiciones de cultivo intensivo por lo que las empresas sobredimensionan la producción con el fin de poder atender la demanda. Dentro de este contexto, las empresas establecen puestas masales a

partir de lotes de reproductores constituidos por un elevado número de peces, entre 40 y 60 animales aproximadamente, en una ratio de dos machos por cada hembra, aunque actualmente existe una tendencia hacia la reducción de los stocks individuales, para que haya diversificación del riesgo e incremento de la eficiencia. Sin embargo, el incremento del número de reproductores en las puestas masales disminuye la contribución familiar a la puesta, a la vez que ésta se hace más asimétrica (Batargias *et al.*, 1997), disminuyendo el censo efectivo e incrementando el nivel de consanguinidad de los lotes de producción destinados a la cría y engorde (Brown *et al.*, 2005a).

Tabla 1.1 Estudios de variabilidad genética en dorada y otras especies de cultivo de interés comercial, mediante marcadores microsatélites.

Especie	Nombre Científico	Nº muestra por población	Nº de locus	Alelos por locus	Heterocigosidad observada	Autores
Dorada	<i>Sparus aurata</i>	932	6	16,5	0,875	Batargias <i>et al.</i> (1999)
		16	12	8	0,712*	Launey <i>et al.</i> (2003)
		270	3	15,8	0,845	Alarcón <i>et al.</i> (2004)
		98	4	17	0,74-0,79	De Innocentiis <i>et al.</i> (2005)
		32	6	16,3	0,885*	Brown <i>et al.</i> (2005a)
		397	11	18,55	0,788	Borrell <i>et al.</i> (2007)
		264	11	17,36	0,774	
		148	17	4-21	0,36-0,94	Navarro <i>et al.</i> (2008)
Dorada japonesa	<i>Pagrus major</i>	550	4	25,9	0,848	Pérez-Enríquez <i>et al.</i> (1999)
Urta	<i>Pagrus auriga</i>	42	8	14,5	0,731	Ponce <i>et al.</i> (2006)
Lenguado	<i>Solea senegalensis</i>	21	10	10,4	0,61*	Funes <i>et al.</i> (2004)
Rodaballo	<i>Psetta máxima</i>	46	3	7	0,67*	Coughlan <i>et al.</i> (1998)
		150	12	9,6	0,74	Bouza <i>et al.</i> (2002)
		34	8	6,88	0,81	Borrell <i>et al.</i> (2004)
		28	8	6,13	0,674	
		25	8	5	0,65	
		26	8	6,75	0,721	
Salmón del Atlántico	<i>Salmo salar</i>	270	15	17,8	0,64	Norris <i>et al.</i> (1999)
		984	12	21,8	0,7	Skaala <i>et al.</i> (2004)
Salmón chinook	<i>Oncorhynchus tshawytscha</i>	2638	10	6,7	0,59	Banks <i>et al.</i> (2000)
Tilapia del Nilo	<i>Oreochromis niloticus</i>	250	6	12,34	0,7	Abdallah <i>et al.</i> (2005)
Pez gato	<i>Ictalurus punctatus</i>	50-100	13	-	0,72	Waldbieser y Wolters (1999)
Carpa común	<i>Cyprinus carpio</i>	-	5	5	0,365	Desvignes y Durand (2001)

* Datos sobre muestras pequeñas de cultivo

Además, la contribución familiar puede ser variable bajo puesta masal ya que en dorada, Navarro *et al.* (2009a) encontraron que 15 machos y 22 hembras participaron de la puesta, de un total de 66 reproductores, definida en una muestra de 300 descendientes analizadas; mientras que Giménez

et al. (2006) y Borrell *et al.* (2008), analizando lotes de reproductores de dentón (*Dentex dentex*), describen que incluso hasta un 80% del total de la puesta puede proceder de sólo dos hembras. Por otro lado, desde el punto de vista genético, la puesta masal tiene la ventaja de que minimiza las fuentes de parecido por ambiente común entre los miembros de la misma familia (Herbinger *et al.*, 1999), e interconecta a los individuos, mediante la formación de familias de medios hermanos, pero tiene el inconveniente de que imposibilita reconocer la genealogía de los peces, cuando la matriz de parentesco entre los individuos es un requisito fundamental para estimar parámetros genéticos de manera exacta en aquellos caracteres de interés económico para el sector industrial.

El uso simultáneo de sistemas de marcaje físico (*Visible Implant Elastomer, VIE*; y *Passive Implant Transponder, PIT*) y marcadores genéticos microsatélites (intra e interespecíficos), permite inferir y trazar la matriz de parentesco de los peces durante el proceso de cría y engorde de los mismos. En relación a los sistemas de marcaje físico, Astorga *et al.* (2005) pusieron a punto el sistema *VIE* para alevines de dorada, útil para el reconocimiento de grupos familiares, estableciendo velocidades altas de marcaje (16 segundos por pez), tasas de retención de la marca máximas y con efectos mínimos sobre la mortalidad de los peces marcados. También en dorada, Navarro *et al.* (2006) establecieron la metodología para marcar individualmente los peces con el sistema de marcaje *PIT*, a partir de los 3 g de peso, sin afectar al crecimiento ni a la mortalidad, y encontrando que la tasa de retención puede ser máxima a partir de los 4 gramos, e independiente del manipulador. Ambos sistemas de marcaje permiten marcar a una velocidad aproximada de 200 peces por persona y hora, lo que posibilita su uso en experimentos que requieran del marcaje de un gran número de peces, como sucede en el desarrollo de esquemas de selección.

Con respecto a los marcadores genéticos, en el caso de 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.*, 2005b; Senger *et al.*, 2006), en dorada japonesa (Takagi *et al.*, 1997), en dorada australiana (*Pagrus auratus*) (Adcock *et al.*, 2000), en besugos (Stockley *et al.*, 2000; Piñera *et al.*, 2006), en breca (*Pagellus erythrinus*) (RamSak *et al.*, 2003), y en urta (Ponce *et al.*, 2006). Además, la conservación de regiones flanqueantes de marcadores microsatélites entre grupos de especies de espáridos ha permitido la amplificación interespecífica (Takagi *et al.*, 1997; Oliva *et al.*, 2003; Brown *et al.*, 2005b; Jean *et al.*, 2006; Piñera *et al.*, 2006; Castro *et al.*, 2007; Roques *et al.*, 2007a, 2007b; Navarro *et al.*, 2008). La aplicación de marcadores microsatélites para la determinación de las relaciones de parentesco en poblaciones de cultivo de dorada ha sido demostrada por Batargias *et al.* (1997), quienes con la utilización de cuatro marcadores específicos asignaron el 98,6% de una muestra de descendientes a 47 parejas, de entre 117 posibles de un stock de reproductores. Estos mismos autores, consiguieron aumentar el número de descendientes asignados a 900, cuando incorporaron dos marcadores más (Batargias *et al.*, 1999). Posteriormente, Piñera *et al.* (2006) utilizaron un total de 11

marcadores microsatélites altamente polimórficos y con una capacidad de exclusión del 99,98% para definir un stock de reproductores en una *hatchery* de dorada, con el objetivo de gestionar su consanguinidad. Más recientemente, Castro *et al.* (2007) reconstruyeron la asignación entre un lote de descendientes (996) y reproductores de dorada (159) mediante el uso de 11 marcadores microsatélites, seis de dorada (Batargias *et al.*, 1999) y cinco de besugo (Stockley *et al.*, 2000), con una probabilidad de exclusión combinada del 99,7%. Navarro *et al.* (2008) evaluó la variabilidad genética de 27 marcadores microsatélites interespecíficos, sobre un total de 148 doradas, (66 reproductores de una empresa y 82 de sus descendientes por puesta masal) 37 bocinegros (*Pagrus pagrus*) y 125 urtas, obteniendo un probabilidad de exclusión combinada a una única pareja de padres de 0,99. Borrell *et al.* (2011) evaluaron la contribución parental de 78 reproductores de dos stocks de una empresa española productora de doradas, asignando el 99,2% de sus descendientes a una pareja de padres, utilizando nueve marcadores interespecíficos.

Para lograr la reconstrucción de las relaciones de parentesco entre una población de peces utilizando marcadores microsatélites, los peces se deben genotipar mediante el uso de la PCR. En sus inicios el genotipado de los peces se hacía de manera individual para cada marcador, lo que presentaba un alto coste económico, tanto por la amplificación como por la carrera en el secuenciador. Posteriormente, se desarrollaron reacciones de PCR múltiplex que permitieron reducir los costes económicos por reacción y optimizar los análisis de reconstrucción de genealogía y variabilidad genética de las poblaciones de cultivo (Navarro *et al.*, 2008). En dorada, cada vez son más las múltiplex desarrolladas a partir de diferentes microsatélites. El genotipar con distintos marcadores, tiene como consecuencia el no poder comparar poblaciones o estudios, además de crear la incertidumbre entre los investigadores y empresas a la hora de decidir qué marcadores o múltiplex utilizar. Todo esto pone de relieve la necesidad de desarrollar un panel estandarizado de marcadores moleculares para esta especie, que sea eficaz, fiable y repetible.

1.3.3. Caracteres Productivos de Interés para la Mejora Genética

Antes de iniciar un programa de mejora genética se deben definir los objetivos u objetivo de mejora, es decir, aquellos caracteres de importancia económica, que pueden variar según la especie e incluso de la población (Gjedrem, 2000). En este sentido, la conversión de alimento es uno de los caracteres más importantes de la producción animal debido a que representa una gran proporción del coste de producción total. Sin embargo, debido a que este carácter es difícil de medir individualmente en condiciones industriales, su mejora se realiza, habitualmente, de manera indirecta, a través del incremento de los caracteres de crecimiento (peso y longitud), dado que presenta una correlación genética elevada y positiva con estos caracteres a sacrificio (McPhee *et al.*, 1979; Afonso, 1996). Así, Gjedrem (2010) indicó que la selección individual para tasa de crecimiento ha sido practicada desde

hace varios años en especies acuícolas. La idea consiste en alcanzar crecimientos más rápidos, que permitan mejorar la relación coste beneficio e incluirlos en los índices de selección para la preselección prematura de los animales.

Estrechamente relacionado con el crecimiento están los caracteres de rendimiento. La elaboración de productos transformados como el fileteado, representa un sector del mercado muy interesante para la industria y para el consumidor, en la medida que se ofrece un producto procesado a un precio asequible y que permite una mayor facilidad para la elaboración del alimento. 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. Más aún, dentro del total de los productos transformados de pescado, dichos porcentajes han sido del 7,9% y 12,9%, respectivamente. Para el caso particular de dorada, Luna *et al.* (2006) han llevado a cabo un estudio exhaustivo sobre la demanda del filete de dorada en el mercado español. En dicho estudio se abordó la influencia de distintos factores en la aceptación por parte del consumidor, como son el precio, el tamaño del filete, la presentación del producto, la promoción del mismo, etc., con el fin de establecer las líneas generales sobre las que deberían enfocarse políticas comerciales que desemboquen en una nueva alternativa de mercado para dorada. Los resultados alcanzados pusieron de relieve que cuanto menor es el precio del filete de dorada mayor cantidad de compradores lo adquieren sin que tuviesen previsto adquirir dorada, siendo más competitivo con otros filetes y pescados. Sin embargo, cuando el precio sube los consumidores que lo adquieren son aquellos a quienes les gusta la dorada y, por tanto, sustituyen la compra de dorada entera en mayor porcentaje. Por otro lado, estos autores hicieron una estima de la demanda según el precio, el cual fue establecido según los empresarios por costes, y según los consumidores por aceptación, sobre los 11 €·kg⁻¹. Ante dichos resultados, el rendimiento filete parece un carácter a considerar, ya que si el precio estuviese entre 11 a 12 €·kg⁻¹, la demanda de filete superaría las 7.000 toneladas año con un incremento de la demanda de dorada de más de 6.100 t·año⁻¹ (Luna *et al.*, 2006).

Otro de los caracteres con repercusión en la producción es la calidad del pez, tanto a nivel de alevín como a talla de sacrificio, con respecto a la presencia de anomalías morfológicas (Afonso y Roo, 2009). En dorada, las deformidades constituyen un problema mayor que afecta tanto a los criaderos como a las empresas de engorde, por comercializar sus productos esencialmente como animales enteros. Así, las empresas de cría se ven obligadas a implantar procesos de criba en sus lotes de producción, lo que añade unos costes asociados a la misma, y que suponen porcentajes variables del precio de venta del alevín, ya que de manera extendida las empresas de engorde no aceptan lotes con más de un 5% de peces deformes. En cuanto a las empresas de engorde, no sólo tienen pérdidas económicas aquellas que comercializan sus productos como animal entero (Beraldo *et al.*, 2003), sino también la industria que comercializa sus productos procesados, a través de los problemas técnicos en la máquina de fileteado que puedan causar los peces menos deformes que externamente se ven

normales (Gjerde *et al.*, 2005). El grado en que las anomalías morfológicas afectan a la viabilidad de las empresas es muy variable, debido a que existe mucha variación entre y dentro de las empresas en cuanto al tipo de deformidad, la prevalencia, la repercusión económica y la especie. En especies como lubina, dorada y bocinegro, las malformaciones más relevantes son las que afectan al complejo opercular, neurocráneo y columna vertebral (lordosis y fusión de vértebras) (Koumoundouros *et al.*, 1997; Boglione *et al.*, 2001; Roo *et al.*, 2005).

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 y 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. Son múltiples los factores que afectan a la apariencia del pescado. Por ejemplo, el color de la piel y la elasticidad de la carne son parámetros que generalmente están incluidos en el análisis sensorial de dorada (Huidobro *et al.*, 2000). La medición instrumental de la textura permite trazar la pérdida de frescura (Ginés *et al.*, 2002). Más aún, es habitual que las empresas incluyan los perfiles nutricionales de sus productos durante el proceso de comercialización de los mismos como un argumento de calidad y trazabilidad. El sabor y la jugosidad están alta y positivamente correlacionados con el contenido de grasa en el músculo (Grigorakis, 2007). Además, los ácidos grasos poliinsaturados del pescado, especialmente el ácido eicosapentaenoico (EPA; 20:5n-3) y el ácido docosahexaenoico (DHA; 22:6n-3), se destacan por su efecto beneficioso para la salud (Sargent *et al.*, 2001). Son esenciales para algunos órganos, tienen un importante papel en la disminución de lípidos en sangre y son precursores en respuestas fisiológicas y bioquímicas. Por otro lado, tienen efectos cardiovasculares favorables, son esenciales en la estructura de las membranas celulares, y juegan un papel importante con respecto a la hipertensión y la diabetes.

1.3.4 Interacción Genotipo - Ambiente

El sistema de producción de dorada presenta claras diferencias ambientales entre empresas durante las fases de cría y engorde. Las empresas de cría pueden producir sus alevines desde tecnología intensiva hasta mesocosmos, habiendo entre ambas un espectro de matizaciones de sistemas de producción. Los alevines a su vez son preengordados y engordados fundamentalmente en jaulas, 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 Mar Mediterráneo. Sin embargo, también se engordan alevines de dorada con el sistema de esteros o estanques 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, y especialmente han sido descritos para el crecimiento y la calidad del pez.

También existen otros factores diferenciadores entre empresas que afectan al crecimiento de dorada como son la madurez sexual (Ginés *et al.*, 2003) y el reparto del alimento (Robaina *et al.*, 1997). La dorada alcanza la primera maduración sexual a la edad de uno o dos años, habiendo notables diferencias entre poblaciones. En Eilat (Israel), Zohar *et al.* (1978) describieron que ya en el primer año de vida todos los individuos que analizaron eran machos perfectamente funcionales, mientras que en otras localizaciones como el sur de Italia, sólo la mitad de los individuos analizados histológicamente alcanzaban algún grado de madurez, aunque sin diferencia macroscópica con los individuos inmaduros (Micale y Perdichizzi, 1990). Por otro lado, la búsqueda de técnicas de alimentación adaptadas a dorada es una estrategia importante para mejorar la ecuación eficacia-coste. Azzaydi *et al.* (1997) concluyeron que el mejor sistema de alimentación es aquel que permite que los peces determinen cuando y cuanto han de comer. En este sentido, Ginés *et al.* (2004a) comprobaron que la dorada mejora el crecimiento y la conversión del alimento y disminuye el coeficiente de variación a través de la libre disponibilidad del alimento mediante comederos de autodemanda durante el engorde. Robaina *et al.* (1997) encontraron diferencias significativas en crecimiento cuando el alimento se reparte una frente a dos, tres o cuatro tomas diarias, ya que en el primer caso crecen menos y convierten peor, mientras que entre los restantes no hay diferencias ni en conversión ni en crecimiento. Sin embargo, las empresas de dorada presentan claras diferencias de localización geográfica y de sistemas de organización y distribución del alimento.

En cuanto al sistema de cultivo, de manera general, se ha sido descrito como factor modulador de la aparición de deformidades esqueléticas, fundamentalmente relacionado con la intensificación de las técnicas de cría, asociando el uso de sistemas extensivos y semi-intensivos con la obtención de peces con muy baja incidencia de deformidades esqueléticas, cuando se comparan con ejemplares cultivados mediante técnicas intensivas (Divanach y Kentouri, 1983; Divanach *et al.*, 1996; Boglione *et al.*, 2001; Koumoundouros *et al.*, 2001; Sfakianakis *et al.*, 2004; Giménez y Estévez, 2005; Roo *et al.*, 2005) (Figura 1.6).

Todas estas diferencias ambientales pueden producir una desviación ambiental en la varianza fenotípica. Si esta desviación no es independiente del genotipo sobre el que actúa, es porque existe una interacción GxA (Falconer y Mackay, 1996). Por ejemplo, una diferencia específica de ambiente puede tener un efecto mayor sobre algunos genotipos que sobre otros, o puede haber un cambio en el ranking de valores genéticos de una serie de genotipos cuando se miden en distintos ambientes.

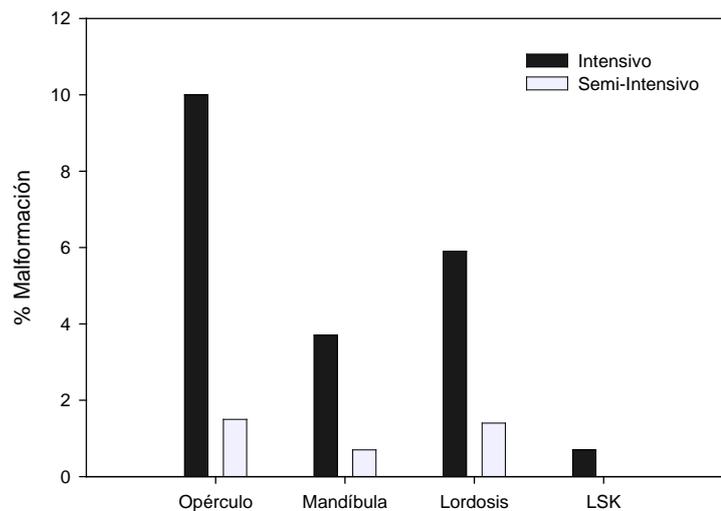


Figura 1.6 Distribución de incidencia de deformidades esqueléticas por sistema de cultivo en dorada (Roo *et al.*, 2005). LSK: triple deformidad (lordosis, escoliosis, cifosis) (Afonso *et al.*, 2000).

Navarro *et al.* (2009a y 2009b) estimaron la interacción GxA en caracteres de crecimiento de dorada a través de correlaciones genéticas de los mismos caracteres en dos ambientes (jaulas insulares y tanques) considerados como caracteres distintos (Falconer y Mackay, 1996), obteniendo resultados que mostraban la falta de interacción GxA. Sin embargo, existen evidencias generales de que la interacción GxA aumenta en animales de cultivo con el incremento de las distancias genéticas y de las diferencias entre ambientes (Dunham *et al.*, 2001), pero en la actualidad no existen antecedentes de que esto se haya medido en doradas entre ambientes más distantes y diferentes.

1.3.5 Evaluación Genética y Reposición

El nivel de confidencialidad de las empresas españolas y mediterráneas de acuicultura es muy elevado, lo cual hace muy difícil conocer con total exactitud el grado en que éstas tienen implementados sistemas de control genético en su sistema de producción. Aún así, es conocido que el sector posee lotes de reproductores y pre-reproductores, a partir de los cuales se hace la reposición, cuando en los primeros se produce mortalidad o cambio de la proporción sexual de los peces debido al carácter proterándrico de dorada. El uso de criterios genéticos mínimos, como es la consanguinidad individual, no está extendido debido al alto coste económico que supone caracterizar los núcleos de reproductores y pre-reproductores con marcadores genéticos, por lo que, de llevarse a cabo, ésta se produce fundamentalmente en las grandes empresas. Es más, todavía existen empresas que minimizan la consanguinidad de sus stocks de reproductores mediante la inclusión de nuevos ejemplares procedentes de la naturaleza.

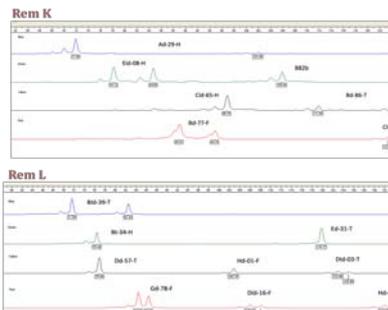
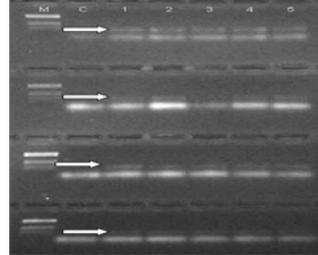
Más lejos aún está la reposición de los núcleos de reproductores con criterios que incluyan el valor mejorante de los peces en las empresas de dorada. Como denotan los similares niveles de variación genética entre poblaciones naturales y de cultivo, la intervención genética es escasa o reciente, cuando es sabido que la implementación de programas de mejora genética desde distintos puntos de vista optimiza las producciones, racionaliza la gestión de la producción y aumenta la competitividad de las empresas, a la vez que preserva las poblaciones naturales. Es más, su implantación da un gran soporte en términos de calidad, trazabilidad y estabilidad.

1.4 OBJETIVOS

Teniendo en cuenta todo esto, el objetivo del presente estudio es protocolizar y estandarizar las herramientas necesarias para desarrollar un esquema de selección en dorada, bajo condiciones industriales, a la vez que iniciar un programa piloto de mejora genética a escala nacional, a partir de peces criados en jaulas, tanques y esteros, en cuatro de las cinco comunidades autónomas productoras de esta especie, mediante los siguientes objetivos específicos:

Objetivos Específicos:

1. Diseñar un panel de referencia de dos nuevas PCRs múltiplex de marcadores microsatélites, que permitan caracterizar de forma fiable y económica stocks de reproductores y descendientes de dorada e inferir sus relaciones de parentesco bajo puesta masal, además de compartir y normalizar resultados de distintas poblaciones.
2. Estimar las heredabilidades de nuevos caracteres de interés y las correlaciones genéticas y fenotípicas entre éstos, con el fin de que el sector industrial disponga de una información que le permita tomar decisiones más adecuadas de cara a explotar la rentabilidad de sus poblaciones sin modificar sustancialmente su idiosincrasia de producción.
3. Cuantificar la interacción genotipo-ambiente a escala nacional a través del cultivo de distintos lotes de descendientes provenientes de distintos stocks de reproductores en diferentes sistemas de engorde (tanques, jaulas flotantes y esteros) y regiones (insular y continental).



2. DESARROLLO DEL PRIMER PANEL ESTANDARIZADO DE DOS NUEVAS PCRS MÚLTIPLEX DE MARCADORES MICROSATÉLITES EN DORADA (*SPARUS AURATA* L.)

Lee-Montero, I., Navarro, A., Borrell, Y., García-Celdran, M., Martín, N., Negrín-Báez, D., Sánchez, J.A., Armero, E., Berbel, C., Zamorano, M.J., Sánchez, J., Estévez, A., Ramis, G., Manchado, M., Afonso, J.M. Development of the first standardized panel of two new microsatellites múltiplex PCRs for gilthead seabream (*Sparus aurata* L.) *Animal Genetics*, (en prensa).

2.1 INTRODUCCIÓN

Como consecuencia del crecimiento y consolidación de la industria productora de dorada, las empresas demandan nuevas mejoras en los ciclos de producción para reducir costes al mismo tiempo que preservar la calidad. Para este propósito, es prioritaria la implementación de programas de selección genética. La producción de dorada se realiza principalmente a través de puestas masales, lo que impide el conocimiento de la genealogía de los peces (reproductores y descendientes) lo cual es imperativo para estimar parámetros genéticos. Por lo tanto, la implementación de programas de mejora, bajo estos condicionantes de producción, necesita tanto sistemas de identificación física (Navarro *et al.*, 2006) como de identificación genética a través de análisis de marcadores moleculares (Navarro *et al.*, 2008), a fin de evitar análisis genéticos costosos en todos los puntos de toma de muestras durante el proceso de crecimiento (Navarro *et al.*, 2009a).

Para promover esquemas de selección genética en la industria de dorada es muy importante disponer de un sistema estandarizado de marcadores para asignar correctamente las relaciones familiares. El número de *loci* necesarios para una asignación eficiente depende de parámetros tales como el tamaño de la población y la diversidad alélica (Bernatchez y Duchesne, 2000; Villanueva *et al.*, 2002), el número de reproductores que contribuyen a la puesta (Blouin *et al.*, 1996; Liu y Cordes, 2004), el nivel de homocigosis (Marshall *et al.*, 1998) o la presencia de alelos nulos (Borrell *et al.*, 2004, Castro *et al.*, 2007; Navarro *et al.*, 2008). Usando un gran número de marcadores microsatélites se asegura una asignación eficaz de las relaciones parentales bajo cualquier situación (Navarro *et al.*, 2008), los cuales, combinados en una reacción de PCR múltiplex, reduce considerablemente los costos.

La PCR múltiplex también reduce el tiempo y los errores asociados, y es una técnica poderosa que puede aumentar la productividad de los estudios genéticos (Neff y Gross, 2000). Sin embargo, los métodos de genotipado llevan asociados posibles errores que deben ser considerados en el momento de estimar la fiabilidad de los resultados (Taberlet *et al.*, 1996; Borrell *et al.*, 2004; Hoffman y Amos, 2005; Castro *et al.*, 2006). Los errores en el genotipado presentan orígenes diversos y complejos, como son la secuencia del ADN de los cebadores, la baja calidad o cantidad del ADN (Borrell *et al.*, 2011) y factores humanos (Hoffman y Amos, 2005; Pompanon *et al.*, 2005). Los errores debidos al factor humano se minimizan a través de reacciones múltiplex, ya que éstas reducen los pasos durante el análisis de la muestra e introducen automatización (Bonin *et al.*, 2004). Identificar y reducir los errores de genotipado inherentes a cada microsatélite (Castro *et al.*, 2004; Hoffman y Amos, 2005; Pampanon *et al.*, 2005; Castro *et al.*, 2006), es también muy importante, especialmente para la reproducibilidad entre laboratorios (Sobel *et al.*, 2002; Weeks *et al.*, 2002).

Launey *et al.* (2003) y Brown *et al.* (2005b) desarrollaron las primeras reacciones de PCR múltiplex para dorada. Estos autores aislaron nuevos microsatélites específicos y propusieron dos múltiplex, de tres y cinco marcadores di-nucleótidos Launey *et al.* (2003), y una de cuatro marcadores también di-nucleótidos Brown *et al.* (2005b). Navarro *et al.* (2008) desarrollaron dos interespecíficas y robustas reacciones múltiplex, RimA de diez y RimB de siete marcadores microsatélites rediseñados, alcanzando el 100% de éxito en las asignaciones parentales a pesar de la presencia de alelos nulos. Porta *et al.* (2010) propusieron dos reacciones múltiplex específicas de cuatro (SaGT4) y seis (SaGT6) marcadores microsatélites di-nucleótidos asignando con éxito el 95% de los descendientes analizados. Borrell *et al.* (2011) desarrollaron una PCR múltiplex (OVIDORPLEX) de nueve marcadores microsatélites (de los cuales cuatro eran interespecíficos) asignando correctamente el 99,2% de los descendientes. Vogiatzi *et al.* (2011) buscaron microsatélites en regiones codificantes derivadas de una base de datos de secuencias expresadas e identificadas de dorada y evaluaron el polimorfismo y el rango alélico de 63 de estos microsatélites que eran di-, tri-, tetra-, penta- y hexa-nucleótidos. A partir de éstos, propusieron cinco PCRs múltiplex de entre cuatro y nueve microsatélites, combinando marcadores que requerían idénticas temperaturas de hibridación.

Este elevado número de PCRs múltiplex desarrolladas para dorada, con un gran número de marcadores microsatélites diferente, impide la comparación entre poblaciones, empresas y grupos de investigación. Esto pone de relieve la necesidad de desarrollar un panel estandarizado de marcadores que podría ser utilizado con seguridad y fiabilidad por todos los usuarios. Un panel de referencia es un conjunto de marcadores altamente polimórficos, específicos y reproducibles recomendados por la Sociedad Internacional de Genética Animal (ISAG en inglés). Para su implementación, previamente debe evaluarse el polimorfismo y errores de genotipado del conjunto de marcadores mediante una prueba de comparación ISAG (CT en inglés) en la que varios laboratorios amplifican los marcadores usando las mismas muestras. Los resultados se discuten en una conferencia de la ISAG y el Comité Permanente publica un resumen con el panel de referencia, e informa a la sociedad científica (ISAG 2001/2002). En especies terrestres donde la mejora genética está bien establecida cada vez son más comunes los paneles de referencia de marcadores. Sin embargo en la actualidad, ninguno ha sido propuesto en peces.

El principal objetivo de este trabajo fue desarrollar PCRs múltiplex, a partir de un amplio espectro de marcadores de microsatélites específicos, que puedan proponerse a la Asociación Internacional de Genética en Acuicultura (IAGA en inglés) como un panel de referencia de marcadores para dorada, siguiendo los siguientes pasos:

- a) diseñar cebadores para 138 marcadores microsatélites del mapa de ligamiento genético de dorada de tal manera que se puedan amplificar usando las mismas condiciones de PCR,
- b) evaluar estos marcadores en función de su variabilidad genética, su rango alélico y facilidad de lectura,
- c) proponer un protocolo para identificar y clasificar los potenciales errores como un método para evaluar la facilidad de lectura de cada marcador,
- d) desarrollar dos PCR múltiplex con once marcadores cada una como un panel de referencia de marcadores para dorada, utilizando los mejores microsatélites,
- e) validar la robustez de estas PCR múltiplex mediante la amplificación de las mismas muestras en cuatro laboratorios diferentes,
- f) comprobar su eficacia en la asignación parental en una muestra de descendientes provenientes de tres puestas masales industriales.

2.2 MATERIALES Y MÉTODOS

2.2.1 Muestras

Se analizaron un total de tres lotes de reproductores de dorada y 256 de su descendientes, pertenecientes a un programa de selección genética (PROGENSA[®], 2009).

De estos 256 peces, seis descendientes del Instituto Canario de Ciencias Marinas (ICCM, Canarias, España), cinco de la empresa PISCIMAR S.L. (PMAR, Cataluña, España) y cinco de la empresa CULMASUR S.A (CSUR, Andalucía, España), se utilizaron como *muestras control* para estudiar la variabilidad genética y la facilidad de lectura de todos los marcadores microsatélites. Cuatro de estas muestras (llamadas *muestras de prueba*) se utilizaron también para optimizar las reacciones de PCR múltiplex. Tres lotes de reproductores (59 reproductores del ICCM, 47 de PMAR y 98 de CSUR), y una muestra de 80 descendientes de cada uno de ellos, se analizaron para validar la utilidad de estas PCRs múltiplex en la asignación parental.

El ADN se extrajo a partir de tejido de aleta (la cual fue previamente conservada en etanol absoluto a temperatura ambiente), utilizando el *kit DNAeasy* (Qiagen[®]), y después se mantuvo a -20°C siguiendo las recomendaciones del fabricante. La calidad y cantidad de ADN se determinó utilizando un espectrofotómetro *Nanodrop 1000 v.3.7* (Thermo Fisher Scientific, Wilmington, EE.UU.). La integridad del ADN se verificó por medio de electroforesis en gel de agarosa al 1% (8 v·cm⁻¹) por tinción con bromuro de etidio (0,5 µg·µl⁻¹) y se analizó con el programa *Quantity One*[®] (Bio-Rad Laboratories, Hemel Hempstead Hertfordshire, Reino Unido), utilizando Lambda Hind III, como marcador de peso molecular.

2.2.2 Evaluación de los Marcadores Microsatélites

2.2.2.1 Diseño de los Cebadores

A partir de todos los marcadores microsatélites publicados en el mapa genético de dorada (Franch *et al.*, 2006; Senger *et al.*, 2006), 138 pares de cebadores fueron diseñados para ser amplificados con las mismas condiciones de PCR. La longitud elegida del amplicón fue de 70 a 200 pares de bases (pb) para optimizar la eficacia de la reacción múltiplex (Dakin y Avise, 2004). Además se consideró que las secuencias flanqueantes no fueran polimórficas y que no presentaran potenciales sitios de sustitución de nucleótidos en los lugares de unión de los cebadores. Durante el diseño de los cebadores también se evitaron secuencias con alta complejidad para asegurar la sensibilidad y especificidad de las PCRs. Se diseñaron con una temperatura de fusión teórica de 60°C±2°C a una concentración de sales (K⁺, Na⁺, Tris⁺ o NH₄⁺) de 180 mM. El contenido de pares de bases GC se mantuvo entre 35 y 60% para evitar la formación de secuencias palíndromas u homopolímeros como el poli (dT) de más de cinco bases.

Se analizó la formación de horquillas o estructuras secundarias de los cebadores usando el programa que se encuentra en la página web *Integrated DNA Technologies* (<http://www.idtdna.com/Scitools/Applications/mFold/>) y se evitaron las estructuras secundarias estables manteniendo el umbral de energía libre por debajo de los $-13 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$ (Yuryev *et al.*, 2002). Las características de los cebadores se eligieron para garantizar la misma eficiencia de amplificación de todos los fragmentos de ADN, tal y como describieron Sánchez *et al.* (2003). Las parejas de cebadores se renombraron con un código interno para facilitar la comprensión de este trabajo.

2.2.2.2 Reacción PCR

Cada marcador microsatélite se probó en una reacción de PCR simple usando las *muestras control*, para confirmar su correcta amplificación, rango alélico, morfología, variabilidad genética y facilidad de lectura. Las condiciones de PCR consistieron en una desnaturalización inicial a 95°C por 10 min, seguido por 28 ciclos de 30 s a 94°C , 1 min a 60°C y 1 min a 65°C , con una extensión final de 60 min a 60°C . El volumen de reacción fue de $12,5 \mu\text{l}$ con las siguientes concentraciones de componentes: 1X *GeneAmp PCR Buffer II* (100 mM Tris-HCl pH 8,3, 500 mM KCl) (Applied Biosystem®, USA), 3 mM MgCl_2 , 0,2 mM de cada dNTP, 0,04 unidades $\cdot\mu\text{l}^{-1}$ de *AmpliTaQ Gold ADN polimerasa* (Applied Biosystem®), 2,4-6,4 $\text{ng}\cdot\mu\text{l}^{-1}$ de ADN molde, y 0,2 μM de cada cebador. Antes de correr los productos de la PCR en el secuenciador automático, se comprobó la correcta amplificación de los amplicones mediante una electroforesis en gel de agarosa al 2% durante 30 min ($8 \text{ v}\cdot\text{cm}^{-1}$).

Después, $1\mu\text{l}$ del producto de PCR (diluido a 75% con agua Milli-Q) se mezcló con $9,75 \mu\text{l}$ de Hi-Di formamida y $0,25 \mu\text{l}$ del marcador de peso molecular *GeneScan LIZ 500* (Applied Biosystem®, USA), y se corrió en un secuenciador automático *ABI Prism® 3130XL* (Applied Biosystem®, USA) de 16 capilares usando POP-7 como polímero (condiciones de carrera: 60°C , 3000 v, 1500 s). Los productos de las PCRs simples realizadas inicialmente se cargaron mezclando tres marcadores teniendo en cuenta su fluorocromo, rango alélico e intensidad de la banda en el gel de agarosa. Los electroferogramas se analizaron usando el programa *GeneMapper* (v.3.7) (Applied Biosystem®, USA).

2.2.2.3 Facilidad de Lectura

Para evaluar la facilidad de lectura o fiabilidad de cada microsatélite se creó un protocolo, llamado *GremmProtocol* (*Genotyping Reliability Evaluation of Microsatellite Markers - Protocol*), que consistió en determinar la tasa de errores o potenciales errores, utilizando una escala para clasificar a los microsatélites por la presencia de éstos. La escala fue del 1 al 3, donde 1 correspondió a un genotipado ambiguo en más del 30% de las muestras, 2 a un genotipado ambiguo en el 30% o menos de las muestras y 3 correspondió a un genotipado fiable en el 100% de las muestras.

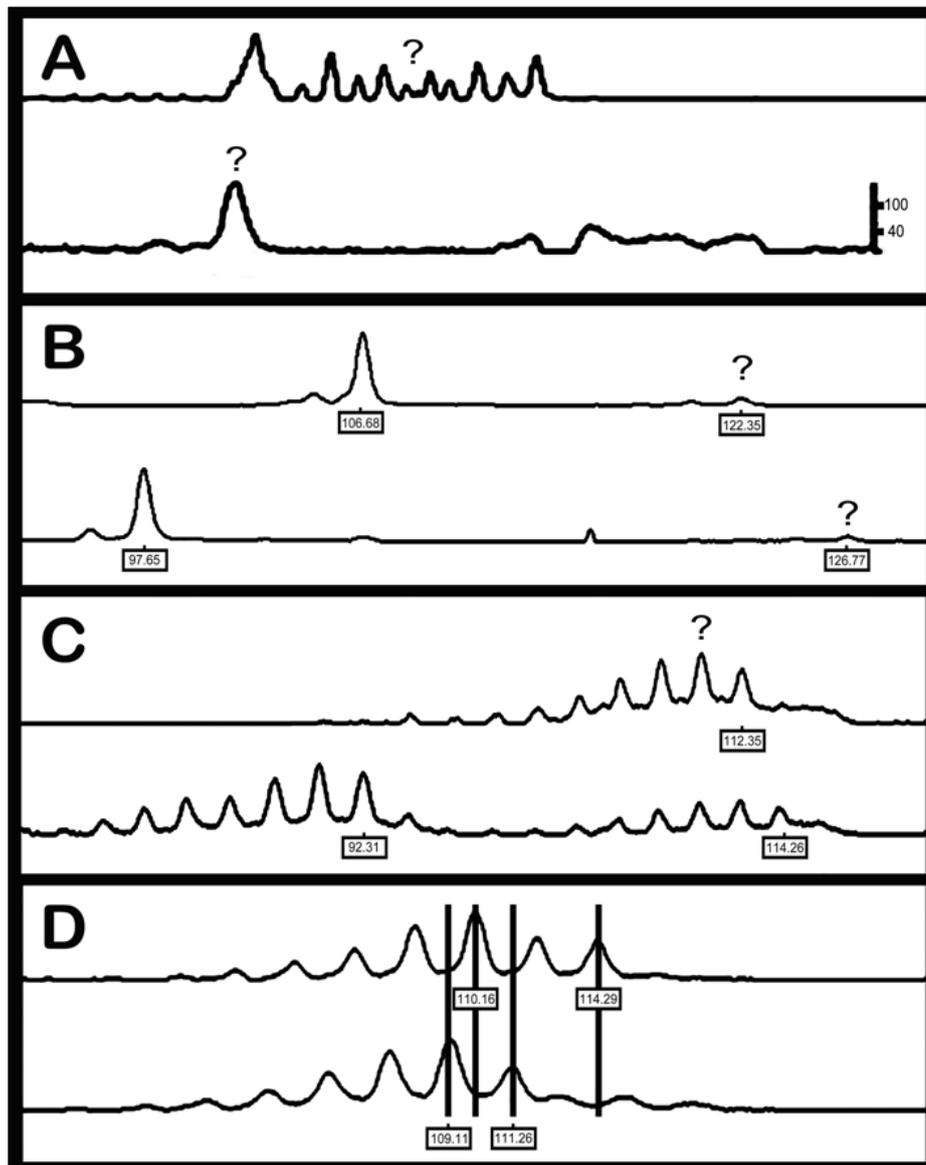


Figura 2.1 Tipos de errores potenciales de genotipado durante el proceso de determinación y redondeado de los alelos del *GremmProtocol*; a) *amplificación inadecuada*, b) *pérdida de un alelo*, c) *patrón de bandas confuso*, d) *alelos intermedios*.

Se consideraron cuatro tipos de errores: de acuerdo a la determinación del alelo; a) *amplificación inadecuada*: alturas de la banda menores de 300 Unidades Relativas de Fluorescencia (RFU), con mucho ruido de fondo o morfología alélica confusa (Figura 2.1A; Pompanon *et al.*, 2005), b) *pérdida de alelo*: amplificación preferencial del alelo ligero con respecto al pesado (Figura 2.1B; Castro *et al.*, 2006); c) *patrón de bandas confuso*: patrón de bandas tartamudas que tienen la última banda más baja que la penúltima lo que hace difícil distinguir entre un homocigoto y un heterocigoto en alelos adyacentes (Figura 2.1C; Hoffman y Amos, 2005); y de acuerdo al redondeado de los alelos, d) *alelos intermedios*: *loci* di-nucleótidos con alelos que difieren en una base entre uno y otro (Figura 2.1D; Castro

et al., 2004). Cada microsatélite se evaluó según el *GremmProtocol*, tras el genotipado de las *muestras control*.

Previamente, se verificó el correcto funcionamiento de los marcadores de peso molecular en todos los electroferogramas, a fin de considerar sólo los errores relacionados con la secuencia de ADN de los cebadores y no con una mala carrera en el secuenciador.

2.2.3 Optimización de las PCRs Súper Múltiplex

Después de la evaluación de los microsatélites, se descartaron aquellos marcadores que no amplificaron, los que tuvieron baja variabilidad genética y aquellos valorados negativamente según el *GremmProtocol*. Finalmente quedó un grupo de 79 marcadores que se consideraron adecuados, al que se le denominó *Radal*. Sus secuencias, el número de acceso al GenBank y los fluorocromos se muestran en la Tabla 2.1. A partir de estos marcadores, se diseñaron dos PCR Múltiplex, llamadas SMsa1 y SMsa2 (**SúperMúltiplex *Sparus aurata***). El número de marcadores incluidos en cada PCR múltiplex fue el más alto posible teniendo en cuenta su grupo de ligamiento (para que no se repitiera en la misma reacción), rango alélico y color del fluorocromo (la distancia mínima entre marcadores con el mismo color fue de 18 pb para evitar solapamientos). Inicialmente, la concentración de los cebadores en cada PCR múltiplex fue de 0,2 μM , y se fue modificando hasta que las bandas de los alelos tuvieran alturas de entre 600 y 3000 RFU tal y como describieron Navarro *et al.* (2008). Aquellos marcadores microsatélites que no amplificaron en las PCRs múltiplex se reemplazaron por otros.

Toda esta puesta a punto de las múltiplex se realizó sobre las *muestras de prueba*. Las condiciones de la PCR fueron las mismas que las utilizadas en las PCR simples ya descritas. Una vez más, previo a la carrera en el secuenciador automático, se comprobó la adecuada amplificación de los amplicones, mediante una electroforesis en gel de agarosa al 2% durante 30 min ($8\text{v}\cdot\text{cm}^{-1}$). Las condiciones del secuenciador automático fueron también las mismas que las de las PCRs simples excepto que los productos de la reacción se diluyeron al 50-85% dependiendo del secuenciador utilizado en cada laboratorio.

Los electroferogramas se analizaron usando el programa *GeneMapper* (v.3.7) utilizando dos *kit de set de bins* creados específicamente para estas reacciones (kit-SMsa1 y kit-SMsa2), los cuales están disponibles en jafonso@dpat.ulpgc.es y son una especie de macros que incluyen los rangos alélicos de todos los marcadores de una múltiplex permitiendo su lectura automática.

Tabla 2.1. Radal: Listado de marcadores microsatélites seleccionados como adecuados en este estudio: código interno (Cl), nombres de los *loci*, número de acceso al GenBank, fluorocromos y secuencias de los cebadores.

Cl	Locus	Acceso	Secuencia del cebador forward (5'→3')	Secuencia del cebador reverse (5'→3')
5'6-FAM				
B 1	Cld-24-H	DQ851306	AGATCCCTCACTGCAGCAA	gtttAGTCTGCATGTTTATATGAGAGCAA
B 3	Gt57	DQ851386	CCTGACTCTTACCCAGTCCG	gtttAATTACTCCTGTGCTGCATTCTG
C 1	Dld-14-H	DQ851338	CCTTGAAAAGGCACTCACTGATAG	gtttATCCCGCTGTCCGAATGA
C 2	Fd-48-F	DQ851374	ATTACAGCCAGAGGACTGGAGAG	gtttCAGAGAGAGTGTCTTGTGTATCTG
C 3	Eld-39-T	DQ851367	GAACGTGTGTGAGAGAGGACAGTTG	GAAGGAAAAATTCTGATTGGAGTTT
C 4	Saimbb16	AJ418652*	ACCTGTTTCTTTGATTTGTTGC	gtttCATAACAGCAGGATAGGTCAGACT
D 2	Saimbb26	AJ418656*	CAATGGCAAAAGCAATGG	gtttAAGTGACGACGACGAGTGTGA
D 4	P3	DQ851284	GAGGGGACACGTAATTTGG	gtttAACAAACAGTCAAATGCTGAGTTGT
E 1	Bd-68-T	DQ851270	AGGGGGCGTTTCAGGTTCT	gtttAGGTTGAGTCCGTCATCAGTGTAT
E 3	Fd-81-F	DQ851377	GGCTGGACATGCTTTTATAGAT	gtttAGCGCTTGAAGATAAAACAACCTCT
F 1	Bi96	DQ851295	TCCAGCTTGGGATCAATAAAGTA	GCTAGTTTTCTGAAACAGTCAATTC
F 2	Cld-26-H	DQ851307	ATGTGAAACAGAGTGGAAAGAAAAC	gtttAGACGACAGACAAAGACCACAGT
G 2	Cld-03-F	DQ851301	ATGACTAAACATCACGTTTATGGAT	gtttAGCTCATGGCTAACTGTGACTTTT
G 3	Hd-23-T	DQ851391	TCTAACTTTCTTTGAGTCCCTCTT	GAGGACAAGCTGAAGTACGAGTC
H 1	P19	DQ851285	GGATCTGCAATATCCACAGTCAAG	gtttCTGGATGCAAAAGCTTTCTCTG
H 2	Dd-56-F	DQ851326	GTAGTGCTGGAACAAGACAAAAG	gtttCGTCAATCCAAAATCTTATCTCTC
I 2	Fd-78-H	DQ851375	CATTTACAGCTAATGCTCAGAGAAA	GTGACTGAAGACAGGTATGAGCAC
J 1	P96	DQ851292	CGCAATTAAGAAGTAGGAGACTGG	gtttGCCAGATGCAGGATGTAAG
J 2	Dld-24-T	DQ851343	AGAGAGCTTCACTGACCCCTGAG	GCTGAAAACGTGGTTTTGTTAGATA
J 3	Bd-06-H	DQ851259	GGCATCAGCAGCAACCAG	gtttAGGTAAATACCACCGCTTCTCAC
K 2	Dd-84-H	DQ851331	GGGTGATGAATTCGTTGAC	gtttCTCTTTTACACACACTTACTACA
K 3	Eld-13-H	DQ851361	CTGACAAAATCTGAAGATCTGAATACTG	GATCCTCTGCTCATCCATCTG
5'NED				
A 5	Bt-14-F	DQ851293	AGCCGAGTACTTCTACTCCTCTGAT	gtttAGTGAGGGCGGACAGATAAAG
B 6	Dt23	DQ851346	ACACAACACACGATTACAGCAGA	gtttCCATGTGAGATGTCACCTATTTTC
D 6	Fd-42-T	DQ851372	TCCAAGAGTGTGAGCAGTCTAATCT	gtttCAGGTCCAACTGCTATCAATTA
E 4	Bld-18-F	DQ851280	AGTGATCGCCTCTGGGTTTTA	GTCTCTCAGCCTTTGAAGTGTATC
E 5	Ef6	AJ418667**	AGAACAATGAAGTCAAGCACTTTC	gtttAGTCTCCTGTGTTTATGATGACTGC
E 6	Sai21	AY322112**	TCAGAGCAGAGCTGTGATTGTAT	gtttACCGAAGCTGATTGTTAGTGTGAT
F 3	Saimbb25	AJ418675*	AGGAAGATGACAGTGGAAACATTAG	gtttCCCTTACCTTTTCTCTTCAACTCA
G 4	Cld-14-F	DQ851304	ATGTGAGTGCACACGTTGGAG	gtttCCTGTGAGTATAGAGAAGCAATAG
G 5	Gd-67-H	DQ851383	CAAGCTCAGGTGTAGCATAGTCTT	gtttAACTGGTTAGGAGTGTGCTAAATG
H 4	B26b	DQ851254	TTGACTTGACCAATATCTCACTCT	gtttTCTCAGGTGACTAACAAAGTGAACAG
H 5	Hd-15-H	DQ851390	CTCTCTCATGCCACTTTCTT	gtttCACCTCCCTCTGATTTATGAGATGAT
I 4	Bd-08-F	DQ851260	GAGACAGCAGGTCGCCTCATC	GACAGAGACTAAAGCTCGACGAA
J 8	Bd-48-T	DQ851265	CAGGGAAAACAACAATGCTG	gtTTCCGACAGGTTGTACATATATCAG
J 9	Fd-46-T	DQ851373	ATTTGACTTGATGATCAGCTGTG	gtTTTTCTGGAGTATGACTGAAAGACA
K 7	Cld-65-H	DQ851315	ATTTATACCACAGCTCAATGACACC	gtTTCTTCTCGTTTATGTAAGTCTGC
K 8	SAH5	AY322110**	CTGTCTTTCTGTCCCTCACACTTAT	gtttCTCAGTTGAAGCATTCTGTAAGTC
M 5	Ci27	DQ851320	GAGACAGAGAGGAAAGAAAAGGATT	gtttCAATGCTACAAGCTCGCTCAG
M 6	Fd10	DQ851370	ACCACTCAACAATGACAGGCTAGT	GGGATCTGAAACATGAGAGAAGAC
M 7	Saimbb20	AJ418655*	GCTGTCTCTACGCTTTCAGCTC	gtttACTTTGCATTTCCCTGCCTAT
5'PET				
A 8	C90b	DQ851299	ACAGAGTCAAGCAGCGGATAAC	gtttCGACCTGCTGAGGAGAACA
A 9	Ad-07-H	DQ851247	AGATTACTTGTCTTAACTGTGGTAGTA	gtttCTTCTTCTGTCTGTCTTTCACG
B 8	Hd-33-F	DQ851394	TGAGTCTACAAAGCCAGAACCA	gtttAAGAGAATAAAGCTCTGCCTGTGC
C 9	Id-39-H	DQ851407	ACCAAAACAGACAGCTGAAGGTTAC	gtttACATTTAGAAAAGGGAGGATCG
C 10	Eld-38-F	DQ851366	TCTGAATAAAAACATTGTCTGCAGTG	gtttCTCAGACGAGATTTTTTGGAAACA
D 9	Cld-44-T	DQ851312	CTTTGACTCCTGACCTTAAATCC	gtttCAGAGTCACTTCTTCTCTCTGT
D 10	SAGT26	Y17266***	GGTTCAGTTGGAGTATGTTTGA	gtttCAGCTATAGAGATGCTGTGTTCTC
E 8	Hd-70-H	DQ851399	TACACACACTCTCTCTTCCAGG	gtttATGGAAGAGGCAGGAATCTTTT
F 4	P54	DQ851289	TGTCTCTATTGTCTCTCTCCTC	gtttTGACCTACAGCGGCATC
F 5	Id-11-H	DQ851402	GAATGTCTGTAATTGTTTGGCTGT	GGTCAATTCACATATATCCATC
F 6	Hd-25-F	DQ851392	AACGGTGTCTCTATTTCCATTATT	GCAGGAATTATCTATGTCTGCCTAA
G 6	Cld-52-T	DQ851314	GTAATCCAACAATGTAGAGTGACG	gtttCCATTAACATGAATGAGGGTGT
G 7	Eld-11-H	DQ851360	TGAAAATCACACAAGTGGATGC	gtttAGAGAGCAGAGAAGAGAGAGTTA
H 6	Dld-09-F	DQ851336	TATTAGCGCGTAAATGTAGGTTCTT	gtttCTGACAAGAGGCTGACAGGAG
H 7	Dld-07-H	DQ851335	CGACAACAGTCAAGAGTAAACAGAT	GCCTGGTCAACCTGAAAC
I 5	Cld-71-T	DQ851316	GCGGTGAAGACTACCTTGAATACTA	GTGTGTTGACAGAAAATGTACAGGA
I 6	Bd-58-F	DQ851267	GGGATAAATACCTGTAAGTGAGCAA	gtttCAATGTTCCACTCACATCC
J 10	Cld-11-T	DQ851303	CGTGTGAAGTTGTGTTAAGTTGTG	GATGGACACGGTGGTTTTAAACA
J 11	Ad-54-F	DQ851243	GTGCATTCAATTGACAGAAAGAGAT	gtttCAACAGTGTATTGTGCTGGAG
L 11	Dld-16-F	DQ851339	GTTGTAGATCGGAGTGTGATAACG	gtttGCTCCGAGTAAGCCATATGTA
M 9	Hd-45-F	DQ851396	ACATACACCAGGCAGGCATAG	gtttGGAATAAGCATTGGGACTT
5'VIC				
A 11	Dd-16-T	DQ851323	ACACACATTTAGGGCACCATATC	gtttAGATTGCGGAAGAAGTATGAGAGAC
A 12	Ad-12-F	DQ851239	GAGCCATTTTCAAGTTTTATTGGTTT	GCCATCCAGCTGGTCTC
C 12	Dt47	DQ851347	TGCCTCTCTTCACTCACTTCTC	GCACATTTGCTCCACACAGAG
D 11	Cld-29-T	DQ851308	GCTCAGCACTACTTTAGTGTGTTGG	gtttCTCAGGGAGGAACAAGAC
D 12	Eld-41-H	DQ851368	GATTCATCGTTTGTAAAGTTGAT	GAGGACGACCTCAACCTCATAC
D 13	Saimbb18	AJ418632*	GTCAGTGATGACATACAGATCACCT	gtttAGTTCAACTTAAAAAGGGCAGAGTT
E 9	Fd-92-H	DQ851379	TAGAGAAAAGGCATTTTGTCAATGAG	GCATCAGACAGACGGGTACAGT
F 7	Hd-77-F	DQ851400	CATGTGTTGTTGTTGTTGTCAGAGTG	gtttCAACATACATGCATAGTGAAGAAAG
G 9	Dld-31-H	DQ851345	AACAACACGCTTGTCTCAGAAC	GAAAACCTAAGGCCTCATTGG
H 8	P60	DQ851290	ATGCTGACATAACACAATGTAGCTC	GAGAAGTGAAGGGATACCTGAG
I 7	Fd-90-H	DQ851378	CAGACTGAGGAGATGGAGGAGAC	gtttAGACTCTGTGTTTGGTACAGCAGAT
I 8	B13b	DQ851252	ATGACAGTGTGTTGAGCTCAGTGTTA	gtttCCTGCATTCCAGCTTCAAGT
I 9	A37	DQ851250	GGTTAGGGTAATCAGAAATGCAATG	gtttCTTCTCCAGTCAAGTCAATAAAG
K 4	Eld-08-H	DQ851358	CTGTTGACGTGGTACTGAATACATC	GGAAAGTTCTGAAAGAATAAAGAAC
K 6	B82b	DQ851257	CGAGAGCAGTGGAAAGCAAG	gtttCCCTCTCCTGTGCTTTTTACTA
M 3	Bld-04-F	DQ851276	GATCTCATTATGACGGATCATTAGC	gtttATCTTTTCCCGATGTTTCCAC
M 4	Dld-22-F	DQ851342	GGTCAGATAGTTCAGTATGGATT	gtttCTCCCTCTACCTCCCAATAAGT

Todos los marcadores fueron descritos originalmente por Franch *et al.* (2006), excepto los que se indican con un asterisco (Argyrokastritis *et al.*, 2002), dos asteriscos (Brown *et al.*, 2005b) o tres asteriscos (Batargias *et al.*, 1999).

2.2.4 Genotipado y Asignación Familiar

Cuatro laboratorios españoles de genética en acuicultura genotiparon las *muestras control* con la SMsa1 y la SMsa2, utilizando los kit de set de bins, para validar la robustez de las mismas en el genotipado. Para probar la utilidad de ambas múltiplex en la asignación parental, se genotiparon con la SMsa1 los tres lotes de reproductores y su descendencia, mientras que con la SMsa2 sólo los reproductores del ICCM y sus descendientes. Cada lote de reproductores se genotipó en un laboratorio diferente utilizando el *GeneMapper* (v.3.7) y el kit de SMsa1-bin. Cada carrera de muestras para genotipar contenía una de las *muestras control* que se utilizó como muestra de referencia (Ref-sa), disponible si se solicita a jafonso@dpat.ulpgc.es. Las asignaciones familiares se determinaron utilizando los genotipos de cada múltiplex PCR de manera independiente.

2.2.5 Análisis de Datos

La heterocigosidad observada (H_o), heterocigosidad esperada (H_e) y el contenido de información polimórfica (PIC) de cada marcador fueron estimados usando el programa *Cervus* (v 3.0.3) (Kalinowski *et al.*, 2007). Los marcadores se ordenaron de acuerdo a su PIC, como altamente informativos ($PIC \geq 0,5$), razonablemente informativos ($0,5 > PIC > 0,25$) y ligeramente informativos ($PIC \leq 0,25$) (Botstein *et al.*, 1980). La frecuencia real de alelos nulos se calculó a partir de los reproductores que contribuyeron a la puesta, mediante el análisis de segregación. La probabilidad de exclusión combinada (PEC) se estimó en cada PCR múltiplex usando el programa *Cervus* (v 3.0.3) con la opción *parent pair* (Jamieson y Taylor, 1997). La *Tasa de Asignación Predicha* (en inglés: *Predicted Assignment Rate* o *Pall*), parámetro propuesto por Vandeputte *et al.* (2011) para evaluar el poder de asignación de los marcadores microsatélites en análisis de pedigrí de peces, se estimó mediante la ecuación número nueve de estos autores.

Las asignaciones parentales entre los reproductores (con sexo desconocido) y sus descendientes se determinaron utilizando el método de exclusión con el programa *VITASSING V.8_2.1* (Vandeputte *et al.*, 2006).

2.3 RESULTADOS

2.3.1 Evaluación de los Marcadores Microsatélites

De los 138 marcadores microsatélites, diez de ellos no amplificaron de forma individual (A3, B9, B11, C5, D8, E7, H3, J4, J12, K12) y dos fueron monomórficos (D3, M1).

En los restantes 126 marcadores, la H_o varió de 0,08 a 1, y la H_e entre 0,121 a 0,976. Aquellos marcadores que mostraron una $H_o < 0,3$ fueron considerados inadecuados (A2, A6, A7, B2, B5, C8, C11, I1, J6, J7, L4, L6, M8). De acuerdo a su valor de PIC, el 77% de los marcadores fueron altamente informativos, el 19,8% fueron razonablemente informativos (A1, A2, A4, A7, A10, B5, B7, B10, C6, C11, D5, E2, E10, I1, J6, K1, K5, L1, L5, L6, L7, L8, L9, L10, L12) y el 3,2% fueron ligeramente informativos (B2, C8, J7, L4). Sólo los marcadores altamente informativos fueron considerados adecuados.

Según el *GremmProtocol*, se encontraron errores o potenciales errores en 20 de los 126 marcadores clasificados con 1 ó 2: cinco marcadores mostraron *amplificación inadecuada* (B10, D1, G8, J6, L3), seis mostraron *pérdida de alelo* (B4, G1, I3, J5, K1 K11,), dos tenían *patrón de bandas confuso* (D7, F8) y siete mostraron *alelo intermedio* en el redondeado de los alelos (C7, H9, K5, K9, K10, L2, M2). Sólo los marcadores clasificados con un 3 se consideraron adecuados.

Al final de la evaluación, quedaron 79 microsatélites seleccionados como adecuados (*Radal*), cuya variabilidad genética y rango alélico se muestra en la Figura 2.2. Los valores medios de estos marcadores fueron 8,2 para el número de alelos (de 3 a 21), 0,762 para H_o (desde 0,364 a 1,0), 0,797 para H_e (0,589 a 0,976) y 0,737 para el PIC. Todos estos marcadores fueron di-nucleótidos excepto cinco que fueron tetra-nucleótidos (B6, F1, F3, I9, M5).

2.3.2 Optimización de las PCRs Súper Múltiplex

A partir del *Radal*, se diseñaron dos PCR múltiplex de 11 marcadores cada una. De los microsatélites inicialmente elegidos para cada reacción múltiplex, el A9 no amplificó correctamente en la SMsa1 y el G4 en la SMsa2, por lo que el marcador A9 se reemplazó por el F6. Sin embargo, no había ningún marcador adecuado que pudiera reemplazar al G4 teniendo en cuenta su grupo de ligamiento, rango alélico y fluorocromo, por lo tanto, se sustituyó por un marcador razonablemente informativo (L7) que cumplía los otros requerimientos (*Locus*: Dd-57-T; código del *GenBank*: DQ851327; secuencia del cebador *forward*: TCATTGTTTCAGATAATGGGACAC; secuencia del cebador *reverse*: gtTTCAAATCTTTTGGTCTGTGC).

Los marcadores de cada PCR múltiplex y sus concentraciones, alcanzadas después de nueve pasos durante la puesta a punto, se presentan en la Tabla 2.2.

Tabla 2.2. Información genética de las Super Múltiplex optimizadas en este estudio para dorada (SMsa1 y SMsa2): Código interno, fluorocromo, grupo de ligamiento (GL), motivo nucleotídico, concentración de cebadores, rango alélico (en pares de bases), número de alelos, heterocigosidad observada y esperada, contenido de información polimórfica y genotipo de la muestra de referencia (Ref-sa) para cada uno de los marcadores microsátélites

Código Interno	Fluoro-cromo	GL	Motivo Nucleotídico	Concentración (µM)	Rango Alélico	Nº alelos	Heterocigosidad Observada	Heterocigosidad Esperada	Contenido Información Polimórfica	Genotipo muestra referencia
<i>SMsa1</i>										
E1	5' 6-FAM	23	di	0,02	72-90	24	0,829	0,778	0,741	78/84
C3	5' 6-FAM	6	di	0,06	104-164	8	0,907	0,937	0,931	128/140
D4	5' 6-FAM	1	di	0,09	171-207	12	0,698	0,829	0,808	199/203
E4	5* NED	11	di	0,06	64-92	4	0,824	0,837	0,819	78/84
A5	5* NED	20	di	0,03	106-112	27	0,624	0,622	0,547	108/110
M5	5* NED	24	tetra	0,08	128-232	6	0,844	0,884	0,873	136/192
L11	5* PET	10	di	0,07	103-113	7	0,727	0,714	0,661	107/109
F6	5* PET	3	di	0,09	130-144	8	0,488	0,498	0,471	140/140
D11	5* VIC	5	di	0,03	76-92	9	0,800	0,807	0,783	76/90
C12	5* VIC	18	di	0,03	121-137	10	0,600	0,610	0,579	123/131
I9	5* VIC	19	tetra	0,04	142-178	13	0,766	0,790	0,757	154/162
<i>SMsa2</i>										
J1	5* 6-FAM	5	di	0,06	76-102	8	0,848	0,828	0,801	84/88
G2	5* 6-FAM	13	di	0,06	113-137	13	0,732	0,808	0,786	117/119
G3	5* 6-FAM	26	di	0,03	150-170	8	0,607	0,667	0,613	164/170
L7	5* NED	16	di	0,05	76-80	3	0,330	0,359	0,312	78/78
H5	5* NED	25	di	0,07	91-123	15	0,884	0,894	0,881	119/119
B6	5* NED	20	tetra	0,05	140-208	16	0,911	0,905	0,893	164/176
F4	5* PET	14	di	0,09	66-90	10	0,670	0,777	0,741	74/82
C10	5* PET	23	di	0,09	127-161	16	0,848	0,858	0,840	135/155
M3	5* VIC	7	di	0,05	83-95	6	0,705	0,702	0,653	87/89
H8	5* VIC	19	di	0,02	108-116	3	0,580	0,664	0,587	114/116
I8	5* VIC	3	di	0,06	128-144	9	0,813	0,757	0,729	134/136

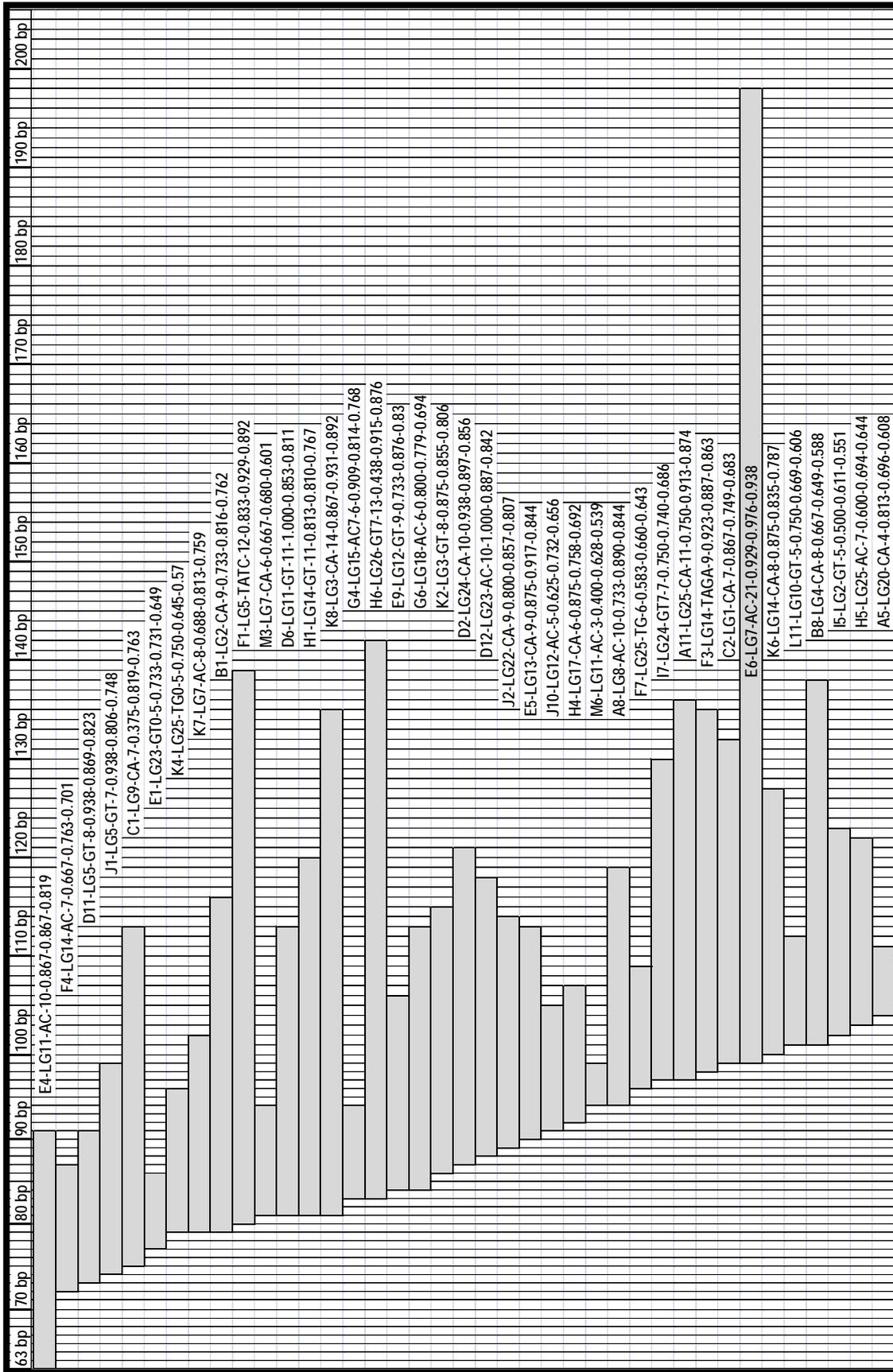


Figura 2.2 Variabilidad genética de los marcadores adecuados de este estudio (Rada), ordenados de acuerdo a su rango alélico y etiquetados en el siguiente orden: Nombre (código interno) – Grupo de Ligamiento- Motivo nucleotídico - Número de alelos – Heterocigosidad observada - Heterocigosidad esperada – Contenido de información Polimórfica.

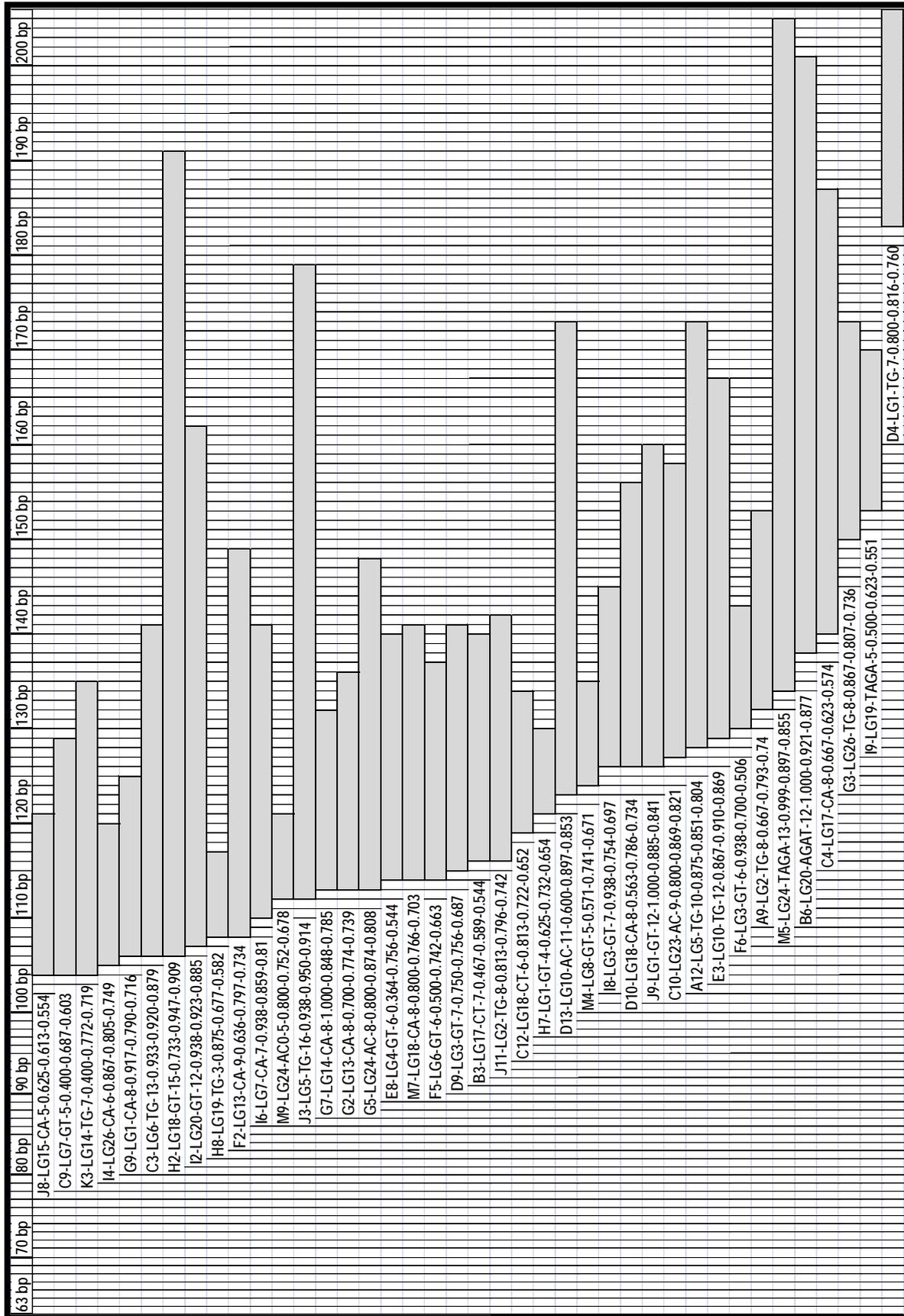


Figura 2.2 (Continuación).

2.3.3 Genotipado y Asignación Familiar

El genotipo de la Ref-sa para cada marcador en la SMsa1 y la SMsa2 y la diversidad genética de cada marcador microsatélite de ambas múltiplex se muestran en la Tabla 2.2.

Los datos de la SMsa1 se obtuvieron a partir de los genotipos de los reproductores del estudio (ICCM, PMAR Y CSUR), mientras que los de la SMsa2 solo a partir de los genotipos de los reproductores del ICCM más 25 descendientes de PMAR y 25 descendientes de CSUR. Los valores medios para la SMsa1 fueron: número de alelos (NA) = 11,6, Ho = 0,737, He = 0,755 y PIC = 0,725 y para la SMsa2: NA = 10,4, Ho = 0,760, He = 0,786 y PIC = 0,752 (sin L7). La PEC *a priori* fue máxima (0,999) para las dos múltiplex, mientras que *Pall* fue 0,899 para SMsa1 y 0,878 para SMsa2. La longitud del amplicón para los *loci* de ambas múltiplex varió desde 64 a 232 pb y sólo tres marcadores presentaron longitudes superiores a 180 pb. La distancia mínima entre marcadores con el mismo color tras del genotipado fue de 5 pb en la SMsa1 y 11 pb en la SMsa2. La variabilidad genética de la SMsa1 fue similar en cada lote de reproductores. Los valores medios para el ICCM fueron Ho = 0,765, He = 0,758, PIC = 0,722, para PMAR fueron Ho = 0,733, He = 0,754, PIC = 0,715 y para el CSUR fueron Ho = 0,723, He = 0,738, PIC = 0,704.

La facilidad de lectura de cada PCR múltiplex se comprobó después de genotipar las *muestras control* en los cuatro laboratorios. El porcentaje de error, es decir, el porcentaje de las diferencias en la asignación de los alelos entre los laboratorios fue del 1% en la SMsa1 y del 0,5% en la SMsa2.

Las asignaciones parentales se determinaron permitiendo tres errores en el programa. El mayor número de errores fueron identificados como alelos nulos. En la SMsa1, la presencia de alelos nulos y sus frecuencias fueron diferentes de acuerdo al lote de reproductores. Los reproductores del ICCM mostraron alelos nulos en los marcadores D4 (0,136) y A5 (0,023), en los de PMAR los marcadores con alelos nulos fueron el D4 (0,611) y C3 (0,833) y en los de CSUR el marcador fue el D4 (0,037). En la SMsa2, sólo presentaron alelos nulos los reproductores del ICCM, en los marcadores M3 (0,045) y G3 (0,028).

Las tasas de asignación parental real con la SMsa1 fueron exitosas en todos los lotes de reproductores. En la descendencia del ICCM y de PMAR se logró un 100% de éxito. Inicialmente, el 2,5% de los descendientes del ICCM fueron asignados a dos parejas de posibles padres, pero después de deducir el sexo de los reproductores de las parejas asignadas, dos de estas parejas resultaron incompatibles. El 88% de los descendientes de CSUR fue asignado a una única pareja de padres y el 12% a dos posibles parejas con un reproductor común. La asignación de los padres mediante SMsa2 sólo se llevó a cabo en la descendencia del ICCM, lográndose el 100% de éxito.

2.4.1 Evaluación de Marcadores Microsatélites

Los microsatélites han proporcionado a los genetistas una poderosa herramienta que ha abierto perspectivas interesantes en muchos campos de investigación, como por ejemplo en la acuicultura (Lo Presti *et al.*, 2009). Éstos tienen una alta sensibilidad para la detección de la variabilidad genética dentro y entre poblaciones, sin embargo, antes de ser aplicados necesitan ser estudiados para conocer su real poder informativo (Wilson y Ferguson, 2002). En este estudio, 138 marcadores microsatélites se han diseñado y evaluado de acuerdo a su variabilidad genética en tres poblaciones diferentes de dorada.

En análisis parentales a gran escala, la H_o y H_e son medidas útiles del grado de información que tiene un *locus* (Nei, 1987). Blouin *et al.* (1996) determinaron que para estimar la relación entre los individuos, se requieren casi dos veces más microsatélites con H_e de 0,62 para conseguir la misma precisión conseguida con un número dado de *loci* con H_e de 0,75. Los microsatélites también proporcionan información sobre el estatus genético de la población. En poblaciones cultivadas de dorada la heterocigosidad media es alta (Castro *et al.*, 2007; Navarro *et al.*, 2008; Porta *et al.*, 2010; Borrell *et al.*, 2011), y similar a la encontrada en este estudio. El valor del PIC en un microsatélite también es una medida del grado de información (Botstein *et al.*, 1980; Hearne *et al.*, 1992) realmente útil en análisis de parentesco (Piñera *et al.*, 2006). En este estudio, el 77% de los marcadores fueron altamente informativos. Además, ningún valor de PIC ha sido citado para los microsatélites en el mapeo genético (Franch *et al.*, 2006; Senger *et al.*, 2006).

En la evaluación de los marcadores microsatélites, la facilidad de lectura o fiabilidad del genotipado es una cuestión tan importante como el grado de polimorfismo (Miquel *et al.*, 2006). Sin embargo, la mayoría de los artículos no hacen mención a la tasa de error obtenida lo que plantea dudas sobre la fiabilidad de algunos de sus genotipos (Bonin *et al.*, 2004). Durante la determinación del genotipo en el electroferograma, surgen dificultades que podrían potencialmente convertirse en errores de genotipado (Pompanon *et al.*, 2005) e influir en las asignaciones parentales (Bonin *et al.*, 2004). En este estudio, los errores de genotipado o potenciales errores, fueron clasificados en cuatro tipos, de acuerdo al nivel de determinación de los alelos y al redondeo de los mismos. La identificación de estos errores o potenciales errores es la clave para una determinación correcta del genotipo. Al mismo tiempo, la facilidad de cada microsatélite genotipado fue evaluado por la cuantificación de estos errores o potenciales errores, mediante el *GremmProtocol*. Este método representa una poderosa herramienta para valorar la fiabilidad del procedimiento del genotipado y permitirá comparaciones entre *loci*, estudios, o laboratorios diferentes. En este estudio, se encontraron algunos errores o potenciales

errores en 14 de los 138 marcadores microsatélites, es decir en el 18%, el error más frecuente fue el de alelos intermedios (en 7 marcadores). Esto está de acuerdo con los resultados encontrados por Castro *et al.* (2006) en lenguado. Otros estudios de microsatélites, han mostrado tasas de error de alrededor del 2% (Castro *et al.*, 2004; Bonin *et al.*, 2004; Hoffman y Amos, 2005). Esta diferencia se debe al hecho de que cualquier posible fuente de error se ha considerado como un error potencial, con el fin de minimizar la probabilidad de que se produzcan errores en aquellos microsatélites que fueron seleccionados como adecuados.

Los *Radal* se utilizaron en este estudio para diseñar las Súper Múltiplex pero además, proporcionan a los genetistas la posibilidad de crear múltiplex personalizadas, dado que sus cebadores se han diseñado para ser amplificados bajo las mismas condiciones de PCR. Sin embargo, esto no excluye la necesidad de una verificación experimental para comprobar la compatibilidad entre los cebadores. La figura 2.2 se puede utilizar para seleccionar los marcadores que combinan de acuerdo a su rango alélico tal y como se hizo en este estudio.

2.4.2 Optimización de las PCRs Súper-Múltiplex

La PCR múltiplex es una tecnología clave para una amplia gama de aplicaciones y de bajo costo (Henegariu *et al.*, 1997; Rachlin *et al.*, 2005). Una vez que una nueva PCR múltiplex se ha diseñado, su evaluación y validación es esencial (Markoulatus *et al.*, 2002). En este estudio, se evaluó y probó la eficacia en la asignación parental de dos nuevas y robustas PCRs múltiplex (SMsa1 y SMsa2) de 11 marcadores cada una. Los marcadores se evaluaron previamente y se seleccionaron en función de su variabilidad y facilidad de lectura.

Según Selkoe y Toonen (2006), los microsatélites de PCR múltiplex deben ser de carácter suficientemente informativo como para garantizar datos de alta calidad. Sin embargo, los microsatélites altamente variables (por ejemplo *loci con* > 25 alelos o 85% de heterocigosidad) pueden presentar complicaciones tales como un incremento en la frecuencia de errores de genotipado (pérdida de alelos y patrones de banda confuso) y altas tasas de mutación. En este estudio el número de alelos promedio y los valores de heterocigosidad de las PCR múltiplex fueron altos y similares a otras PCRs múltiplex de dorada (Launey *et al.*, 2003; Navarro *et al.*, 2008; Porta *et al.*, 2010; Vogiatzi *et al.*, 2011), aunque inferiores a las descritas por Borrell *et al.* (2011). Además, el nivel de polimorfismo de los marcadores microsatélites también depende de las características de la población (Vandeputte *et al.*, 2011), no obstante la variabilidad encontrada en este estudio (con PCR múltiplex evaluadas en tres poblaciones geográficamente diferentes) pueden representar la variabilidad de dorada de acuicultura en España. Por otro lado, los marcadores utilizados en este estudio no son secuencias codificantes, a diferencia de los marcadores múltiplex utilizados por Vogiatzi *et al.* (2011) (EST-SSR). Los microsatélites en regiones no codificantes tienen una mayor probabilidad de mantener su variabilidad genética a lo largo del tiempo,

especialmente cuando se utilizan en mejora genética sometidos a presión de selección, mientras que la selección durante generaciones sucesivas, puede disminuir la variabilidad en los marcadores de zonas codificantes (Chistiakov *et al.*, 2006).

Cuando muchos marcadores se utilizan en una múltiplex, sus tamaños deben ser similares para evitar la amplificación diferencial de tamaños distintos, debido a la naturaleza competitiva de la PCR múltiplex, pues los alelos de longitud corta a menudo amplifican de manera más eficiente que los de longitud larga (Dakin y Avise, 2004), especialmente cuando la calidad del ADN es baja (Pompanon *et al.*, 2005). De hecho, en la múltiplex RimA de Navarro *et al.* (2008), dos microsatélites de alto peso molecular se perdían cuando el ADN estaba degradado. En este estudio, los tamaños del amplicón fueron más cortos y homogéneos que los utilizados en otras múltiplex de dorada (Launey *et al.*, 2003; Navarro *et al.*, 2008; Porta *et al.*, 2010; Borrell *et al.*, 2011; Vogiatzi *et al.*, 2011). Otra característica en las múltiplex es el espacio entre los marcadores, que es importante para evitar que los marcadores del mismo color se solapen (Bonin *et al.*, 2004). En este estudio, inicialmente se estableció un espacio de separación grande. Como era de esperar, éste se redujo después del genotipado, pero se evitó el solapamiento. Esto es notable si se considera el hecho de que las muestras provenían de tres poblaciones diferentes.

La comunidad dedicada a la ciencia forense en humanos ha elegido trabajar con motivos de repetición de marcadores microsatélites más bien largos, ya que tienen una menor probabilidad de error (Perlin *et al.*, 1995; Gagneux *et al.*, 1997; Van de Goor *et al.*, 2009a). Sin embargo, los estudios genéticos en peces han utilizado tradicionalmente marcadores di-nucleótidos, ya que se han aislado sólo unos pocos tri- o tetra-nucleótidos y, en general, éstos muestran una menor variabilidad (Van de Goor *et al.*, 2009b). De hecho, los nuevos marcadores tri-, tetra-, penta- y hexa-nucleótidos estudiados por Vogiatzi *et al.* (2011) mostraron una variabilidad mucho menor que sus di-nucleótidos. Este estudio aporta cinco marcadores tetra-nucleótidos altamente informativos evaluados como adecuados, tres de los cuales se incluyen en las múltiplex propuestas. Además, todos los marcadores di-nucleótidos fueron óptimamente diseñados para minimizar la producción de bandas tartamudas y la adición extra de la Taq polimerasa de una adenina más (Sánchez *et al.*, 2003), además de que se evaluó previamente su facilidad de lectura.

La longitud del mapa de ligamiento genético de dorada es de 1.241,9 cM y presenta 26 grupos de ligamientos (GL) (Franch *et al.*, 2006; Senger *et al.*, 2006). La búsqueda de QTLs y la selección asistida por marcadores (en inglés: MAS) son herramientas cada vez más importantes en la selección genética debido a la dificultad de hacer directamente la Selección Asistida por Genes (en inglés: GAS). Para una detección de QTLs eficiente, es necesario un mapa de ligamiento genético con un buen nivel de saturación de marcadores moleculares, datos fenotípicos adecuados y un apropiado modelo genético - estadístico (Lynch y Walsh, 1998). Las dos reacciones múltiplex desarrolladas en este estudio incluyen 18

grupos de ligamiento, lo que significa 70% de los GL que del mapa genético de dorada está cubierto, lo que hace de éstas una excelente herramienta y complementaria para búsquedas de QTLs. Considerando todas las PCRs múltiplex publicada para dorada (Launey *et al.*, 2003; Brown *et al.*, 2005b; Navarro *et al.*, 2008; Porta *et al.*, 2010; Borrell *et al.*, 2011; Vogiatzi *et al.*, 2011), las que se proponen en este estudio son las únicas cuyas posiciones de los marcadores dentro del mapa genético de dorada son conocidas.

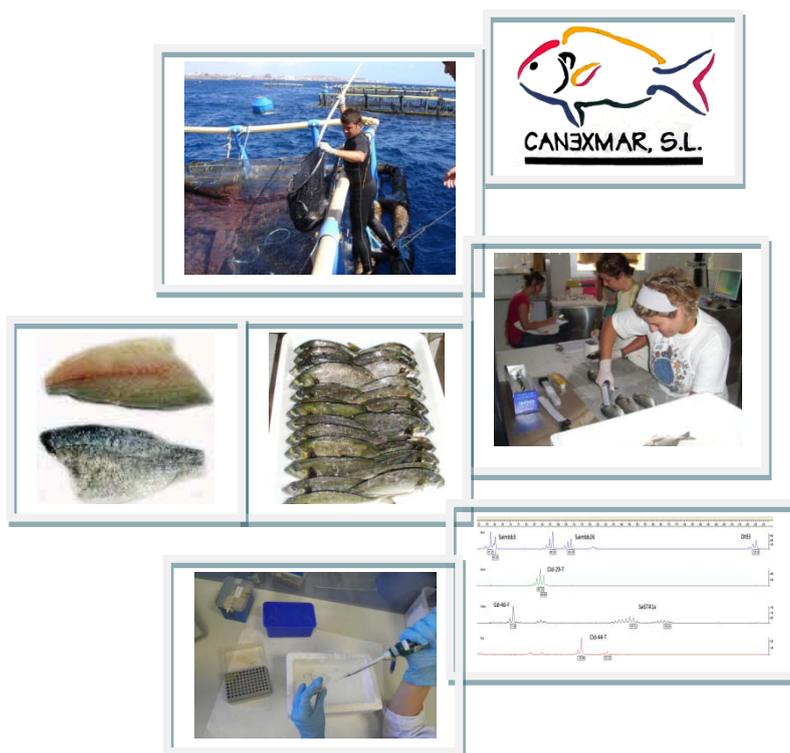
Otra aplicación de las PCRs múltiplex de microsatélites es la reconstrucción de las relaciones familiares. La inferencia correcta de la genealogía en los programas de mejora genética es fundamental para estimar parámetros genéticos y para el control de los reproductores (Navarro *et al.*, 2009a). En la selección genética, es extremadamente importante obtener altas y fiables tasas de asignación, ya que el costo de criar y obtener las características fenotípicas de los candidatos, es elevado y cada pez no asignado representa una pérdida neta (Vandeputte *et al.*, 2011). El poder de asignación de una reacción múltiplex depende del número de marcadores elegidos y de su nivel de polimorfismo. Esto ha sido tradicionalmente determinado por el PEC, un parámetro teórico ampliamente utilizado, aunque, según Navarro *et al.* (2008) y Vandeputte *et al.* (2011), en selección de peces esta tasa es sobre-estimada cuando se compara con la asignación real. Vandeputte *et al.* (2011) proponen un nuevo parámetro: la tasa de asignación predicha (*Pall*), que calcularon en diversas múltiplex comprobando que cuando el PEC sobreestima el valor real, el *Pall* es más representativo de la realidad. Sin embargo, en este estudio, ambos parámetros se calcularon para las dos múltiplex, evidenciando que, cuando el número de marcadores de microsatélites es muy alto, como en este caso, el PEC es próximo al valor real, pero la tasa de asignación predicha subestima el valor real. El poder de discriminación de una múltiplex puede estar influenciada por la posición de los marcadores en el mapa genético. Todos los microsatélites de cada múltiplex de este estudio se encuentran situados en grupos de ligamiento diferentes lo que ofrece una ventaja significativa en asignación parental.

Navarro *et al.* (2008) determinaron que al menos siete marcadores microsatélites eran requeridos para obtener un 100% de éxito en la inferencia parental en una puesta masal de 60 reproductores, bajo condiciones industriales, pero usaron diez en su estudio. Vandeputte *et al.* (2011) también recomendaron incluir marcadores en exceso para garantizar la asignación en cualquier circunstancia. En este estudio, fue exitoso utilizar por separado cada PCR múltiplex propuesta de 11 marcadores cada una para la asignación de parentesco (100% de asignación en peces de ICCM y PMAR). Los descendientes de los CSUR (sólo genotipados con la SMsa1) no alcanzaron una asignación del 100%. Esto se debió la similitud genética de dos reproductores (Marshall *et al.*, 1998; Borrell *et al.*, 2002) los cuales tenían los mismos genotipos en seis de los once marcadores de la SMsa1. Estos dos reproductores formaban las dos posibles parejas de padres de los individuos no asignados. Es de destacar que este lote de reproductores era muy numeroso y que este problema se resolvería usando la SMsa2. Otra posible causa de falta de asignaciones entre padres y descendientes es la presencia de alelos nulos (Marshall *et al.*, 1998). En este estudio, ambas múltiplex mostraron alelos nulos en las tres

poblaciones estudiadas, incluso siendo marcadores específicos (aunque, no habían sido probados en dorada). El marcador D4 mostró la mayor frecuencia de alelos nulos, lo que probablemente se debe a sus alelos tan pesados (Chapuis y Estoup, 2007). No obstante, la identificación de alelos nulos se realizó fácilmente y no afectó a la eficacia de las múltiples para la asignación de parentesco. Cuando se reconocen, los alelos nulos se recodifican manualmente según lo recomendado por Navarro *et al.* (2008), y las asignaciones de parentesco se consiguen sin errores. De hecho, estos autores, también asignaron un 100% de los descendientes a pesar de la presencia de alelos nulos, gracias a la incorporación de un gran número de marcadores microsatélites.

Otro factor decisivo en la asignación de paternidad es la tasa de errores de genotipado (Bonin *et al.*, 2004; McKelvey y Schwartz, 2004; Pompanon *et al.*, 2005; Miquel *et al.*, 2006). Las tasas de errores (Marshall *et al.*, 1998) obtenidas después del genotipado en ambas múltiples fueron mínimas (1% para SMsa1 y 0,5% para SMsa2) debido a que los marcadores propuestos habían sido previamente evaluados. Además, la tasa de error disminuyó a medida que se genotiparon más muestras (datos no mostrados), debido al conocimiento de la morfología de los alelos. Estas tasas de errores iniciales fueron muy similares a los reportados por Borrell *et al.* (2011) y menores a las reportadas por Castro *et al.* (2004). Aunque cabe destacar que estas tasas se obtuvieron tras el genotipado realizado en laboratorios diferentes, lo que revela una gran reproducibilidad y consistencia.

El estandarizado de las pruebas genéticas es importante para el intercambio de información, combinación de bases de datos y el manejo de las poblaciones. La comunidad científica supervisa y proporciona a la industria paneles de referencia para la determinación del parentesco y la identificación individual (Lipinski *et al.*, 2007). La Sociedad Internacional de Genética Animal (ISAG) proporciona el apoyo a la metodología de estandarización internacional a través de las *pruebas de comparación* (CT). El objetivo de esta prueba es que los laboratorios que trabajan en inmunogenética, ADN y polimorfismos bioquímicos de animales estandaricen las técnicas y logren acuerdos internacionales sobre nomenclaturas y tipificación de procedimientos, fomentando la investigación. Esta prueba se desarrolla a partir de muestras de ADN analizadas en diferentes laboratorios, que comparten los resultados de identificación individual y análisis de parentesco (ISAG, 2001/02). En este estudio, se evaluaron 138 marcadores y se validaron dos PCRs múltiplex siguiendo estas recomendaciones, permitiéndonos proponer un panel de referencia para dorada reproducible, estandarizado y uniforme que consta de 22 microsatélites distribuidos en dos múltiples. Estas múltiples constituyen una herramienta eficaz y robusta para la identificación individual, la reconstrucción de pedigrí y el desarrollo de metodologías para la mejora genética, y apoyarán el primer programa de mejora genética de dorada a escala nacional española (PROGENSA®, 2009). Al mismo tiempo, siguiendo las recomendaciones de ISAG, este panel de referencia puede ser modificado y mejorado más adelante, mediante la sustitución de algunos marcadores por otros más adecuados, cambiando colores o añadiendo otros nuevos (Delghandi *et al.*, 2003).



3. ESTIMACIÓN DE PARÁMETROS GENÉTICOS PARA CARACTERES DE CRECIMIENTO Y CALIDAD E INTERACCIÓN GENOTIPO-AMBIENTE EN DORADA (*Sparus aurata* L.)

Lee-Montero, I., Navarro, A., Negrín-Báez, D., García-Celdran, M., Sánchez J.A., Martín, N., M., Zamorano, Estévez, A., Ramis, G., Manchado, M., Afonso, J.M. Genetics parameters and GxE interactions for growth and deformities traits at different ages on gilthead seabream (*Sparus aurata* L.) in four Spanish companies. *Aquaculture* (en preparación)

Lee-Montero, I., Navarro, A., Negrín-Báez, D., Zamorano, M., Afonso, J.M. Estimates of heritabilities for morphological traits estimated from image analysis data and genetic correlations with deformity traits on gilthead seabream (*Sparus aurata* L.). *Aquaculture* (en preparación)

Lee-Montero, I., Navarro, A., Negrín-Báez, D., Zamorano, M., Ginés, R., Afonso, J.M. Heritabilities and genetic correlations of new quality traits on gilthead seabream (*Sparus aurata* L.), under industrial conditions. *Aquaculture* (en preparación)

Navarro, A., Manchado, M., Estévez, A., Ramis, G., Lee-Montero, I., Ponce, M., Sánchez, J.A., Armero, E., Negrín-Báez, D., Puertas, M.A., Borrell, Y., García, M., Sánchez, J.J., Crespo, A.M., Blanco, G., Mariadolores, E., Zamorano, M.J., Martín, N., Aguilera, C., Roo, F.J., Toro, M.A., Afonso, J.M. Estimación de parámetros genéticos en dorada (*Sparus aurata* L.) para caracteres de interés industrial (PROGENSA®). XVI Reunión de Mejora Genética. Ciutadella de Menorca. Mayo-Junio 2012.

Lee, I., Afonso, J.M., Manchado, M., Estévez, A., Ramis, G., Roo, F.J., Ponce, M., Sánchez, J.A., Armero, E., Berbel, A., Asturiano, J., García, M., Navarro, A., Aparicio, C.M., Aguilera, C., Sánchez, J.J., Mariadolores, E., Zamorano, M.J., Toro, M.A. Development of genetic improvement program in gilthead seabream (*Sparus aurata* L.) (PROGENSA®). Encuentros Cambridge, Integrating Chilean Research Worldwide. Reino Unido, Agosto 2010.

Afonso, J.M., Manchado, M., Estévez, A., Ramis, G., Roo, F.J., Ponce, M., Sánchez, J.A., Armero, E., Lee, I., Berbel, A., Asturiano, J., Mariadolores, E. Navarro, A., Aparicio, C.M., Aguilera, C., Sánchez, J.J., Zamorano, M.J., Toro, M.A. Desarrollo de un programa piloto de mejora genética en dorada (*Sparus aurata* L.) (PROGENSA®). XIII Congreso Nacional de Acuicultura, Madrid, Noviembre 2009.

3.1 INTRODUCCIÓN

El crecimiento y consolidación de la industria de dorada 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 implican 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 (Falconer y Mackay, 1996). 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 (Toro y López-Fanjul, 2009). Sin embargo, depende de la especie e incluso de la población (Gjedrem, 2000).

En dorada, al igual que ocurre en otras especies de aptitud cárnica, la conversión del alimento es uno de los caracteres más importantes, desde el punto de vista económico, ya que representa una gran proporción del costo de producción total, alcanzando el 40% del valor final del producto en dorada (Jover, 2007) durante el engorde en jaulas oceánicas. Sin embargo, debido a que este carácter es difícil de medir en condiciones industriales a nivel de individual, su mejora se realiza indirectamente, a través del incremento de los caracteres de crecimiento (peso y longitud) (Navarro *et al.*, 2009a) dado que presenta una correlación genética elevada y positiva con estos caracteres (McPhee *et al.*, 1979; Afonso, 1996).

Estrechamente relacionado con el crecimiento están los caracteres de rendimiento. La elaboración de productos transformados como el fileteado, representa un sector del mercado muy interesante para la industria y para el consumidor, en la medida que se ofrece un producto procesado a un precio asequible y que permite una mayor facilidad para la elaboración del alimento. En dorada, aunque esta es una vía de comercialización que aún queda por explotar, estudios de mercado muestran que sería una industria interesante, rentable y de mucha demanda (Luna, 2006).

La morfología es también un carácter económicamente relevante. En la producción animal y vegetal la apariencia de los productos (p.ej. forma, tamaño, color y ausencia de defectos como deformidades) cobra una gran importancia a la hora de su comercialización, jugando un papel clave en la decisión final por parte del consumidor (Blonk *et al.*, 2010; Costa *et al.*, 2011). En el ámbito de la mercadotecnia y la publicidad es muy utilizada la frase “todo entra por la vista”, lo cual se acentúa en el caso de los productos de acuicultura y en especial de aquellos productos que como la dorada se

comercializan como pez entero, teniendo influencia en la depreciación (Elvingson y Johansson, 1993). Como variables morfológicas, podemos incluir la compacidad, variables morfométricas y prevalencia de deformidades.

Las anomalías o deformidades en peces, tanto a nivel de alevín como a talla de sacrificio, determinan la calidad del pez y tienen una repercusión económica muy alta (Afonso y Roo, 2009). La industria de dorada, a pesar del rápido crecimiento que ha tenido, no se encuentra en la actualidad exenta de problemas, al igual que muchas otras especies marinas. Uno de ellos es la alta incidencia de malformaciones (Roo *et al.*, 2005; Afonso y Roo, 2009; Izquierdo *et al.*, 2010; Fernández *et al.*, 2012). Las deformidades merman las capacidades fisiológicas para un buen desarrollo, disminuyen la tasa de crecimiento, aumentan la mortalidad y también tienen implicaciones importantes desde el punto de vista del bienestar animal (Karahán *et al.*, 2012.). Además los peces con alguna malformación son menos aceptados por los consumidores (Bardon *et al.*, 2009), lo que repercute en la producción y comercialización (Boglione y Costa, 2011), y con más intensidad en los peces que se venden como pez entero, puesto que las deformidades son evidentes (Beraldo *et al.*, 2003), pudiendo llegar a producir pérdidas del 5% de las ganancias en peces en juveniles y adultos (Andrades, 1996). En general, las deformidades en piscicultura son un problema que ha sido ampliamente estudiado, pero parcialmente comprendido (Witten *et al.*, 2009; Boglione y Costa, 2011), y en los que pueden influir factores físicos, químicos, nutricionales, biológicos, fisiológicos, ambientales y genéticos (Thankappan y Thampy, 1990; Chatain, 1994; Lall y Lewis-McCrea, 2007; Afonso y Roo, 2009; Roo *et al.*, 2009; Izquierdo *et al.*, 2010; Boglione y Costa, 2011). En cuanto a factores técnicos relacionados con los sistemas de cultivo, existe una relación significativa entre desarrollo osteológico y deformidades esqueléticas con la intensidad del sistema de cultivo (Boglione *et al.*, 2001; Roo *et al.*, 2009, 2010a, 2010b), por lo que los peces criados en condiciones extensivas presentan una menor prevalencia de deformidades esqueléticas que aquellos criados en sistemas intensivos y similar a los juveniles salvajes (Roo *et al.*, 2010c).

Las principales deformidades en peces pueden agruparse en cinco categorías: forma, pigmentación, escamas, esqueléticas y vejiga natatoria (Divanch *et al.*, 1996). De éstas, las esqueléticas (neurocráneo o cabeza, columna vertebral y esqueleto apendicular) son las más importantes, ya que alteran de manera severa la morfología de los peces cultivados (Afonso y Roo, 2009). Dentro de las deformidades de cabeza, se encuentran las anomalías asociadas al complejo opercular y a la mandíbula (Galeotti *et al.*, 2000; Cobcroft *et al.*, 2001; Beraldo *et al.*, 2003; Cobcroft *et al.*, 2004; Fraser y Nys, 2005; Verhaegen *et al.*, 2007; Morel *et al.*, 2010). Dentro de las de la columna vertebral, las deformidades más comunes son la lordosis (deformidad dorsal, forma en V), escoliosis (deformidad lateral, forma de zigzag), cifosis (deformidad ventral, forma en Λ) y fusión de vértebras (Afonso *et al.*, 2000). En dorada, al igual que en otros espáridos como el bocinegro, lubina y dorada japonesa, las malformaciones más

relevantes son las que afectan al complejo opercular, neurocráneo y columna vertebral (lordosis y fusión de vertebras) (Afonso y Roo, 2009; Roo *et al.*, 2009).

Por otro lado, la calidad de la carne es un parámetro muy valorado actualmente, 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 y 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 aún 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 dorada. La variación en el porcentaje de lípidos se refleja en el porcentaje de agua, ya que ambos son complementarios, debido a la necesidad de los peces para mantener una densidad ligeramente mayor que la del agua (Iles y Wood, 1965). Por lo tanto, la medición de uno puede servir para determinar la del otro, si la relación es conocida. En este sentido el medidor *Distell Fish Fatmeter* (Distell.com, West Lothian, Escocia) utiliza este hecho para establecer el contenido de grasa. Este aparato, es un método novedoso, rápido y no invasivo que mediante un sensor de microcinta que es sensible al contenido de agua de la muestra y usando datos de calibración de especies, determina el porcentaje de grasa muscular del animal, vivo o muerto. La textura de la carne es otra variable de calidad. Además de ser un trazador de la pérdida de frescura (Ginés *et al.*, 2002), está relacionada con la firmeza y elasticidad de la carne, atributos importantes a valorar en el desarrollo de un análisis descriptivo cualitativo llevado a cabo por jueces entrenados en un panel de cata (Regost *et al.*, 2003; Rincón *et al.*, 2009). La textura puede ser medida de manera instrumental y rápida mediante un texturómetro, o analizando la cantidad de colágeno. Éste forma el principal tejido conectivo entre las células, siendo los filetes más blandos los de menor contenido en colágeno (Hatae *et al.*, 1986), además, 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 (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 (Grigorakis, 2007). También significa energía que se desecha, ya que cuando los peces son eviscerados, la grasa visceral es retirada junto con el tracto intestinal (Navarro *et al.*, 2009b).

Antes de establecer los objetivos o criterios de selección en un programa de mejora es necesario conocer cuanta de la variación fenotípica de esos caracteres es determinada genéticamente, para saber si se pueden o no mejorar mediante selección genética (Falconer y McKay, 1996). Aunque la tasa de progreso genético pueda parecer pequeña en relación con las atribuibles a los avances en nutrición o

manejo, debe tenerse en cuenta que, a diferencia de estos últimos, la ganancia genética es continua, acumulativa y permanente (Toro y López-Fanjul, 2009). Sin embargo, son pocos los parámetros genéticos que han sido publicados en dorada para estos caracteres económicamente importantes, y menos aún los que se han estimado bajo condiciones industriales: Knibb *et al.* (1997) estimaron una heredabilidad realizada para el peso al sacrificio, a partir de la respuesta a una selección masal divergente después de una generación. Posteriormente Navarro *et al.* (2009a y 2009b) estimaron heredabilidades bajo condiciones industriales, a partir de peces engordados en Canarias tanto en tanques como en jaulas insulares, para caracteres de crecimiento, de la canal y de composición de la carne a talla de ración. Estos autores trabajaron en una muestra de descendientes provenientes de un lote de reproductores del Grupo industrial español Tinamenor S.A., a distintas edades de interés comercial (alevín, preengorde, primera maduración incipiente y talla de ración). Acerca de la determinación genética de las deformidades Afonso *et al.* (2000) describieron inicialmente una asociación familiar estadísticamente significativa para una triple deformidad de columna en sentido antero-posterior, mediante cruces dirigidos. Posteriormente, Astorga *et al.* (2004) estudiaron 38 tipos de deformidades morfológicas que aparecieron en dicho esquema, simples o combinaciones de éstas, sobre descendientes provenientes de un lote de reproductores con control individual del apareamiento, estimando heredabilidades de 0,85 para el carácter presencia-ausencia de cualquier tipo de deformidad. Thorland *et al.* (2006), en la empresa griega KEGO S.A., estimaron heredabilidades de 0,12 para la presencia-ausencia de la deformidad de cabeza y deformidades espinales. Por el contrario Castro *et al.* (2008) a escala experimental, no evidenciaron componente genético para las deformidades lordosis y opérculo. Por último, en un estudio de segregación en dorada, Rodríguez *et al.* (2011) revelaron a través de análisis fenotípico, un alto y significativo porcentaje de deformidad en descendientes cuando uno de sus padres era deforme, sugiriendo la posibilidad de determinación genética en la incidencia de deformidades para lordosis y fusión de vertebras.

El conocimiento de las correlaciones genéticas entre los caracteres de interés también es primordial para un programa de mejora eficiente, ya que la selección de un carácter puede acarrear una respuesta correlacionada no deseada en otro carácter o por el contrario, un carácter puede ser mejorado intencionadamente de manera indirecta a través de otro (Falconer y McKay, 1996). De ahí lo importante de buscar nuevos parámetros rápidos, fáciles de medir y no invasivos que puedan estar correlacionados con los caracteres de interés y que puedan sustituir variables que en algunos casos además de engorrosas y lentas para medir, involucran el sacrificio del animal. Los caracteres morfológicos parecen ser un buen recurso para esto, al igual que se han utilizado en animales terrestres en los que se han encontrado algunos correlacionados con caracteres productivos (Simm, 1998; Conafe, 2012).

Para mejorar la eficiencia de selección, los registros de los caracteres deben registrarse objetivamente (sin sesgos personales), de manera precisa y a un bajo costo (Gjedrem, 1997). Tecnologías como el análisis de imágenes han sido desarrolladas exitosamente en animales terrestres y plantas sometidas a mejora genética (Osawa *et al.*, 2008; Rius-Vilarrasa *et al.*, 2009, 2010; Costa *et al.*, 2011). Esta tecnología permite el registro de caracteres de la forma del individuo, tanto de tipo lineal como dimensional, unificándolas en un objetivo, proporcionando una rápida, repetible y fiable información, útil para programas de selección genética. Otra ventaja es que es un método no invasivo que puede analizar los peces *in vivo*, además de que los peces sufren poca manipulación y estrés influyendo positivamente en su crecimiento, salud y supervivencia (Ruff *et al.*, 1995). El principal obstáculo de este método de análisis en un estudio a gran escala, como es un esquema de selección genética, es que normalmente la etapa de segmentación de la imagen no es totalmente automática, siendo necesaria el anclamiento manual de determinados puntos (Stien *et al.*, 2006). En este sentido, la aplicación de análisis de imagen "IMAFISH_ML" desarrollada en MatLab v.7.5 (The Math-Works Inc, Massachusetts, USA) por Navarro *et al.* (en preparación), es un método que a partir de sólo dos fotos del pez, analiza los archivos de manera totalmente automática y proporciona más de 25 variables morfométricas. Existen parámetros genéticos publicados para variables morfométricas en algunas especies como carpa común (Kocour *et al.*, 2007), lubina (Costa *et al.*, 2010), solea común (*Solea solea*) (Blonk *et al.*, 2010), tilapia del Nilo (Rutten *et al.*, 2005) y trucha arcoíris (Gjerde, 1989; Kause *et al.*, 2003), revelando que en general tienen una alta determinación genética y que tienen un gran potencial para ser incluidas en programas de mejora, sustituyendo o no a otras variables productivas. Sin embargo, en dorada no existen estimas de parámetros genéticos para este tipo de variables.

Al mismo tiempo, el sistema de producción de dorada presenta claras diferencias ambientales. Las empresas de cría pueden producir sus alevines desde tecnología intensiva hasta mesocosmos, habiendo entre ambas un espectro de matizaciones de producción. 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. También existen otros factores diferenciadores entre empresas como son la madurez sexual (Ginés *et al.*, 2003) y el reparto del alimento (Robaina *et al.*, 1997). 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, como son las variables de crecimiento, de la canal y de calidad. Si esta desviación fenotípica no es independiente del genotipo sobre el que actúa, es porque existe una interacción GxA (Falconer y Mackay, 1996). Por lo que es de utilidad estimar las interacciones GxA, ya que si éstas existen, y no se tienen en cuenta, pueden limitar o

incluso perjudicar el progreso genético (Saillant *et al.*, 2006; Dupont-Nivet *et al.*, 2008), ya que la evaluación genética de los reproductores debería hacerse dentro de cada ambiente. Incluso, los programas de mejora se pueden ver forzados a desarrollar cepas para condiciones ambientales específicas (Winkelman y Peterson, 1994). Por eso, para desarrollar con eficacia un programa de mejora se requiere el conocimiento de los parámetros genéticos y ambientales, las diferencias entre cepas o animales mejorados y el potencial de cada genotipo por ambiente (Winkelman y Peterson, 1994). En este sentido, Navarro *et al.* (2009a, 2009b) estimaron en dorada la interacción GxA entre jaulas insulares y tanques, en caracteres de crecimiento, canal y calidad de la carne, a partir de peces engordados sólo en Canarias, a través de correlaciones genéticas de los mismos caracteres en dos ambientes, considerados como caracteres distintos (Falconer y Mackay, 1996), obteniendo resultados que mostraban la falta de interacción GxA. Pero en la actualidad no existen antecedentes de que se haya medido interacción GxA en doradas entre ambientes más distantes y diferentes.

Teniendo en cuenta todo esto, el objetivo del presente estudio es estimar en dorada el grado de determinación genética y las relaciones entre ellas, de variables de crecimiento, de la canal, de calidad del pez y de la carne y morfométricas mediante imágenes, a diferentes edades de interés comercial, y su interacción GxA en los diferentes sistemas de engorde industrial propios de la producción española de esta especie. Con el fin, de sentar las bases para un programa de mejora genética a escala nacional, proponiendo los criterios de selección más óptimos para mejorar el máximo de variables de interés económico para esta especie, de la manera más rápida, económica, rentable y automática.

3.2. MATERIALES Y MÉTODOS

3.2.1 Material Biológico

Huevos procedentes de lotes industriales de tres comunidades autónomas con una combinación de sexos y número de reproductores diferente: ICCM (Instituto Canario de Ciencias Marinas, Canarias) 59 (2♂:1♀), CULMASUR S.A. (Andalucía) 98 (1♂:1♀) y PISCIMAR S.L. (Valencia) 47 (1♂:1♀), se sembraron en las instalaciones de los centros de investigación de acuicultura (CIA) de tres comunidades autónomas (ICCM-Canarias, Instituto de Investigación y Formación Agraria y Pesquera o IFAPA-Andalucía, Instituto de Investigación y Tecnología Agroalimentaria o IRTA-Cataluña). El cultivo larvario se inició en abril de 2009 de manera sincronizada entre todas las comunidades autónomas y la metodología aplicada para el cultivo desde la etapa de huevos hasta la de alevines se basó en los protocolos establecidos por Roo *et al.* (2009). Se utilizó tecnología intensiva en el IFAPA (Andalucía), semi-intensiva en el IRTA (Cataluña) e intensiva en el ICCM (Canarias), sobre la base estándar de uso de enriquecedores, artemia y dietas de destete, ajustados a las necesidades biológicas según estadio del desarrollo. El crecimiento se midió a través de los parámetros morfométricos de longitud total (LT), altura de la cabeza (HC), diámetro del ojo (DO) y estado general de las larvas a los 5, 10, 20, 30, 40, 50 y 65 días post eclosión (dpe) del cultivo. Las medidas se realizaron con un proyector de perfiles (V-12A Nikon, Japan, o similar). A día 84 dpe, una muestra al azar de 1400 peces de cada centro fue remitida a los restantes centros, incluyendo el Instituto Murciano de Investigación y Desarrollo Agrario y Alimentario (IMIDA) de la región de Murcia, por vía aérea o transporte por carretera. A día 179 dpe los alevines fueron marcados con *Passive Integrated Transponder* (PIT; Trovan Daimler-Benz), en la cavidad abdominal, siguiendo el protocolo de marcaje descrito por Navarro *et al.* (2006), a la vez que se les extrajo un trozo de aleta caudal para ser conservado en etanol hasta su análisis genético. Cada CIA marcó 2.400 peces, entre los cuales estaban representados proporcionalmente los alevines provenientes de los centros ICCM, IFAPA e IRTA. Posteriormente, los peces marcados en cada CIA fueron divididos en dos lotes, uno de 550 peces que permaneció en cada CIA y otro de 1.900 peces que fue enviado a la empresa colaboradora de cada región: PIM S.A. en esteros (Andalucía), CULTIMAR S.A. (Cataluña) y SERVICIOS ATUNEROS DEL MEDITERRÁNEO S.L. (Murcia) en jaulas continentales, y CANEXMAR S.L. (Canarias) en jaulas insulares. En ambos tipos de lotes estuvieron igualmente representados los peces criados en los diferentes CIA productores de alevines (Figura 3.1).

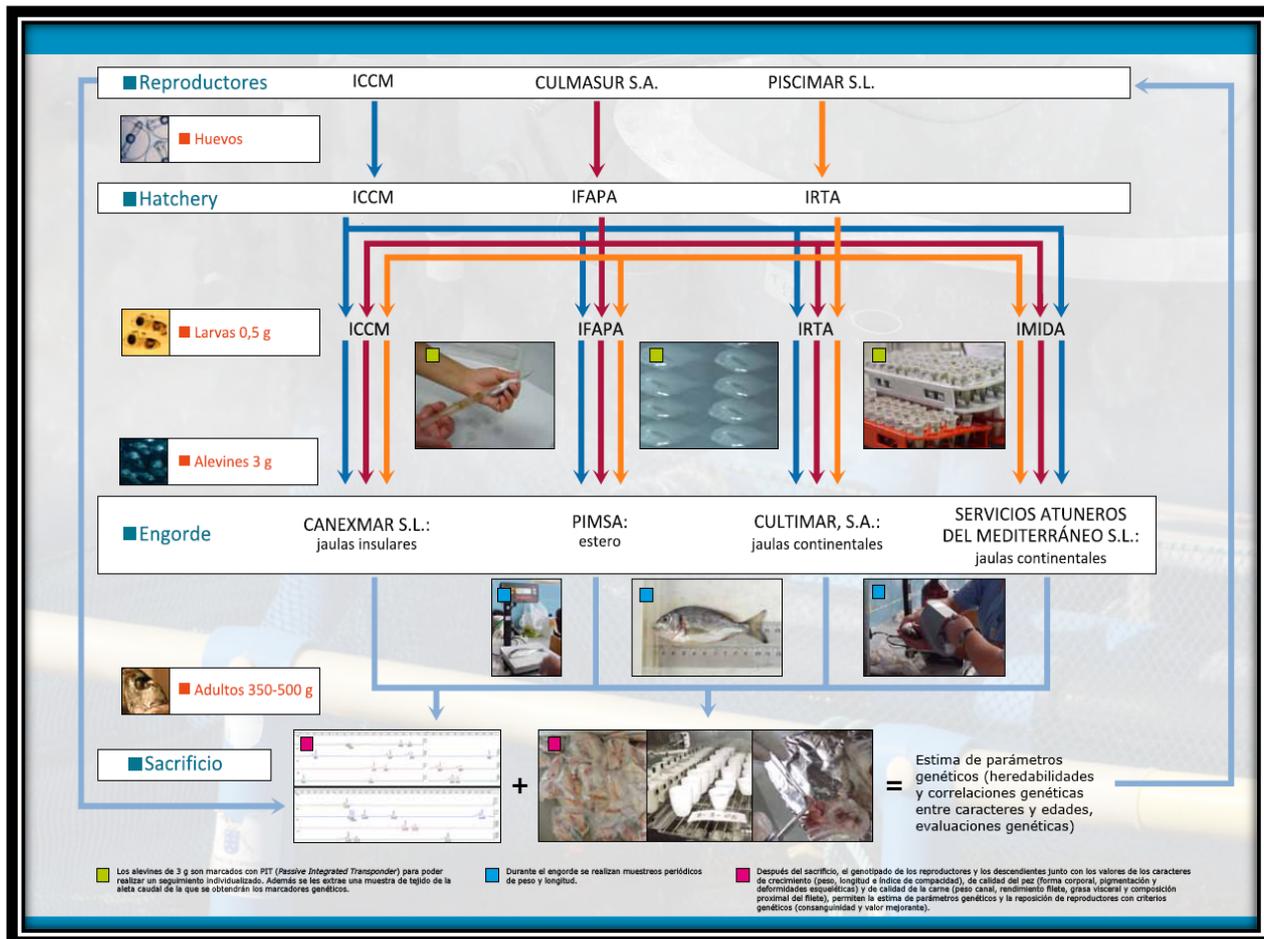


Figura 3.1 Esquema de integración de la mejora genética en el tejido industrial de dorada (PROGENSA®)

En Canarias, los peces que quedaron en el ICCM, se mantuvieron en 3 tanques de 1 m³ con flujo abierto de 22 l/min y aireación constante. A medida que los peces fueron creciendo se desdoblaron hasta llegar a 12 tanques de tal manera que la densidad no sobrepasara los 26 kg/m³. La alimentación fue *ad libitum* y diaria, a través de alimentadores de autodemanda, con alimento balanceado disponible en el mercado, de acuerdo a su tamaño y edad. La medición de los parámetros abióticos de temperatura, oxígeno disuelto y saturación de gases se realizó con un oxímetro portátil (Oxiguard Handy, Point tour Systems Inc., Canada), una vez al día. La extracción de peces muertos se realizaba inmediatamente cuando se detectaba y la limpieza de los tanques una vez a la semana. La temperatura del agua varió entre los 20,2°C en época invernal y 24,2°C en época estival, con una media de 22,04±0,13°C (media ± error típico) la concentración de oxígeno varió entre 4,4 y 7,7 mg/l con una media de 5,61±0,04 mg/l y la saturación de gases estuvo entre los 63 y 97% con una media de 76,37±0,61 %.

En la empresa CANEXMAR S.L. los peces se engordaron en una jaula de 12 m de diámetro situada en la zona de Punta del Morro, Gran Canaria, un sistema marino Atlántico insular y oligotrófico. La temperatura media del agua fue de 20,68±0,68°C y con salinidad de 37‰. En la empresa PIM S.A. los

peces fueron engordados en la zona de marismas del río Guadalquivir, ecosistema húmedo y terrestre situado a 15 km de la desembocadura y en la mitad sur de la Isla Mayor de este importante río del sur de España, en un estero de 2000 m³. La temperatura media del agua fue de 18,2±0,24°C, la salinidad media de 6,9±0,14 ‰ y la concentración media de oxígeno de 5,73±0,06 mg/l. En la empresa CULTIMAR S.A. los peces se engordaron en el sistema marino continental del mar Mediterráneo, en una jaula de 9 m de diámetro, ubicada en Arenys de Mar, Barcelona. La temperatura media fue de 17,5±3,9°C y la salinidad de 37,8‰. En la empresa Servicios Atuneros del Mediterráneo S.L los peces se engordaron también en un sistema marino en una jaula de 11 m de diámetro en San Pedro del Pinatar, Murcia. La temperatura media fue de 15,7±0,9°C, con una temperatura mínima de 14,3°C y máxima de 17,2°C y la salinidad fue de 37,9±0,1‰.

En las cuatro empresas, los peces se engordaron durante 17 meses bajo condiciones industriales. Los peces se alimentaron con alimento balanceado una vez al día, 6 veces a la semana. En ningún momento de esta experiencia, durante la cría o el engorde, los peces fueron sometidos a criba, a diferencia de lo que ocurre a nivel industrial.

3.2.2 Muestreos

A los 269, 389 y 539 dpe, todos los peces engordados en el ICCM y una muestra al azar de los criados en CANEXMAR S.L., exceptuando los 269 dpe, se anestesiaron (aceite de clavo al 4%) identificaron, pesaron, midieron (longitud furcal) y se valoraron si presentaban algún tipo de deformidad. Cuando los peces en las cuatro comunidades autónomas, alcanzaron la talla comercial (300-800 g), a los 689 dpe, se sacrificó y se muestreó, de manera simultánea, una muestra de 150 peces del ICCM y una muestra de aproximadamente 1.000 peces de cada empresa, analizando los siguientes caracteres:

a) Crecimiento:

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

b) Rendimiento:

- i. **Peso canal:** Peso del pez una vez eviscerado manualmente (incluyendo el riñón) y secado.
- ii. **Rendimiento canal:** Peso canal expresado como porcentaje del peso del pez sin eviscerar ($100 \cdot \text{peso canal} \cdot \text{peso pez}^{-1}$).
- iii. **Peso filete:** Peso de los filetes de ambas caras del pez, tras haberle quitado la piel al pez. El sistema de fileteo fue manual y se obtuvo mediante un corte perpendicular al eje longitudinal del pez, justo detrás del opérculo, inicialmente en dirección a la columna vertebral y posteriormente hacia la aleta caudal siguiendo paralelo a la columna, eliminando las espinas de la ventresca (Figura 3.2 C).
- iv. **Rendimiento filete:** Peso filete expresado como porcentaje del peso del pez sin eviscerar ($100 \cdot \text{peso filete} \cdot \text{peso pez}^{-1}$).

c) Calidad:

- i. **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.
- ii. **Porcentaje de grasa visceral:** Peso de la grasa visceral expresada como porcentaje del peso del pez ($100 \cdot \text{peso grasa visceral} \cdot \text{peso pez}^{-1}$).
- iii. **Fuerza máxima:** Variable de textura medida con un texturómetro Stable Micro Systems (TA.TXT, Surrey, UK) sobre el lomo del pez entero, en la posición A (Figura 3.2 A) según Ginés *et al.* (2002), con un test de análisis de perfil (TPA) para el cual se empleó un émbolo de compresión de aluminio de 25 mm de diámetro (SMSP/25). La penetración fue de 7 mm con velocidad en muestra de 5 mm/s y fuerza de activación de 0,5 N, con doble compresión por muestra (Tryggvadottir y Olafsdottir, 2000; Ginés *et al.*, 2004b). Los datos del texturómetro se analizaron con el programa *Exponent lite Express v5.0.8.0* (Stable Micro Systems).
- iv. **Contenido de lípidos totales en el músculo:** Estimación del porcentaje de lípidos en el músculo medido con el *Distell Fish Fatmeter* (Distell.com, West Lothian, Escocia) sobre el pez entero en la posición B (Figura 3.2 B), realizando cuatro medidas, dos por cada cara del pez, siguiendo las recomendaciones del manual. Este aparato es un método no invasivo que mediante un sensor de microcinta que es sensible al contenido de agua de la muestra y usando datos de calibración de especies, determina el porcentaje de grasa muscular del animal.

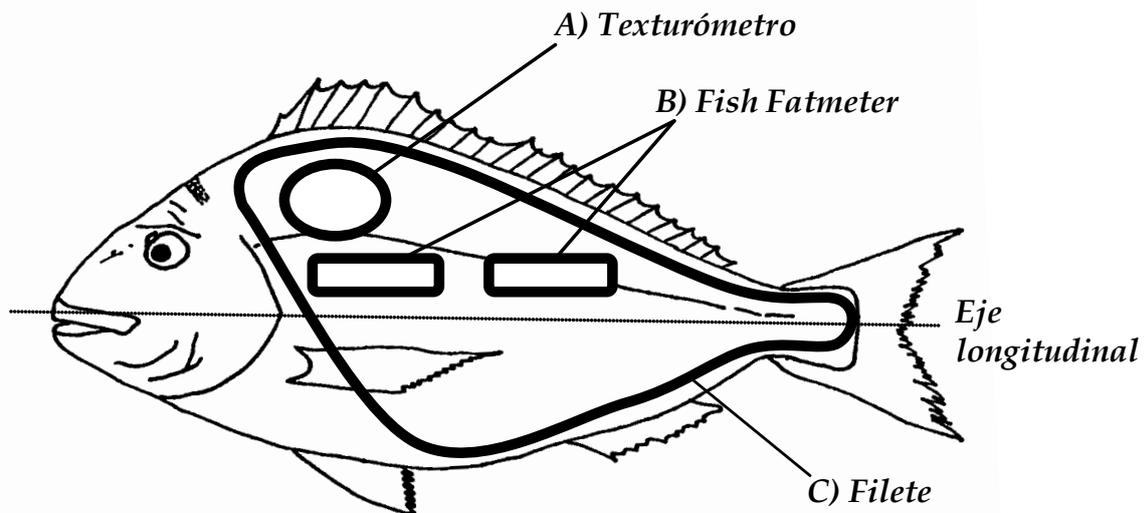


Figura 3.2 Medidas realizadas en dorada como pez entero. A) El círculo muestra posición del émbolo en la medida de la fuerza máxima con el texturómetro; B) Los rectángulos muestran las dos posiciones de las medidas realizadas en cada cara del pez con el *Fish Fatmeter*; C) La línea negra muestra el contorno del área del filete obtenido en cada pez.

- v. **Composición química del músculo:** Después de pesados los filetes, se envasaron al vacío y se congelaron a -20°C hasta el análisis de la composición de la carne, para el cual se enviaron los filetes en frío por mensajería, al Centro de Monells del IRTA donde se homogenizaron y analizaron con el método indirecto de espectroscopia en infrarrojo cercano (Near Infrared Spectroscopy, NIR) usando el equipo *Foodscan LAB* (FOSS; Dinamarca) del Centro de Monells del IRTA y se obtuvieron las siguientes variables, como porcentajes del músculo fresco:
1. Humedad
 2. Lípidos
 3. Proteínas
 4. Colágeno
- vi. **Prevalencia de Deformidades:** Las deformidades se determinaron visualmente mediante una valoración interna por observación directa de la espina dorsal, después de ser fileteados. Durante el crecimiento se determinaron sólo mediante una valoración externa. Las deformidades identificadas fueron: lordosis, escoliosis, cifosis y fusión de vértebras, agrupadas en “deformidades de columna”, acortamiento del opérculo nombrado como “deformidad de opérculo” y por último deformidad de mandíbula y de cabeza, nombradas como “deformidad de cabeza”. Para cada uno de estos cuatro grupos de deformidades, los peces fueron clasificados como deforme (1) o no deforme

(0). La tasa de prevalencia de deformidades se calculó como porcentaje de individuos deformes respecto al total analizados en ese punto de muestreo.

- vii. **Variables morfológicas:** Para poder obtener estos datos, cada pez fue fotografiado con una cámara digital, en vista lateral (el pez tumbado Figura 3.3 A) y vista dorsal (el pez de pie Figura 3.3 B, sobre una pieza de madera moldeada para tal fin), en un cuarto oscuro con luz controlada tal y como recomiendan Navarro *et al.* (en preparación). Posteriormente se analizaron todas las fotografías de manera totalmente automática con la aplicación de análisis de imagen "IMAFISH_ML" desarrollada en MatLab v.7.5 (The Math-Works Inc, Massachusetts, USA) por Navarro *et al.* (en preparación). Las variables obtenidas nombradas como longitudes son medidas paralelas al eje longitudinal del pez (en Figura 3.3.A desde x_1 a x_6), los altos son medidas perpendiculares a este eje (en Figura 3.3A ejes y_1, y_2, y_3, y_4 , dirección vientre-lomo) y los anchos son las medidas de izquierda a derecha en vista dorsal (Figura 3.3B eje z_1). En total se obtuvieron 27 variables, las que se describen a continuación:

A partir de la imagen en vista lateral (Figura 3.3.A):

1. *Área total lateral (ATL)*. Corresponde al área comprendida dentro de la línea gruesa del contorno de la figura que forma el pez.
2. *Longitud total lateral (LTL)*. Entre x_1 y x_6 del eje horizontal.
3. *Alto máximo del pez (AIM)*. Corresponde al eje y_2 .
4. *Alto pedúnculo caudal (AIPC)*. Corresponde al eje y_3 .
5. *Longitud furcal (LF)*. Entre x_1 y x_5 del eje horizontal
6. *Alto de la cabeza (AICa)*. Corresponde al eje y_1 .
7. *Área del filete (AF)*. Área desde la línea de corte de la cabeza (y_1) hasta el punto más estrecho de la cola (y_3).
8. *Porcentaje del área del filete (%AF)*. Con respecto al área total del pez. Corresponde al $[(\text{Área filete} \cdot \text{Área Total del pez}^{-1}) \cdot 100]$.
9. *Longitud estándar (LS)*. Desde x_1 hasta x_4 del eje horizontal.
10. *Longitud máxima del filete (LMF)*. Desde x_2 a x_3 del eje horizontal.
11. *Excentricidad del pez ($0 < e < 1$) (Exp)*. Da una idea de lo ovalado que puede ser el pez sin la cola. Comprendiendo el área entre x_1 a x_3 . Si $e=0$ la forma del pez se asemeja a un círculo, y si vale 1 se asemeja a una línea.
12. *Excentricidad de la cabeza ($0 < e < 1$) (ExCa)*. Da una idea de lo ovalada que puede ser la cabeza. Comprendiendo el área entre x_1 a x_2 .
13. *Longitud sin Cola (LSC)*. Desde x_1 a x_3 , en eje horizontal.
14. *Cinco altos del pez equi-espaciados (AIA; AIB; AIC; AID; AIE)*. La longitud total se divide en seis partes iguales y se miden los altos en esos cinco puntos. El **a** es el más cercano a la cabeza y el **e** a la cola.

A partir de la imagen en vista dorsal (Figura 3.3B):

15. *Área total dorsal* (ATD). Corresponde al área comprendida dentro de la línea gruesa del contorno de la figura que forma el pez.
16. *Longitud total dorsal* (LTD). Coincide con la longitud del eje horizontal entre x_1 y x_7 .
17. *Ancho máximo* (AnM). Eje z_1 .
18. *Cinco anchos del pez equi-espaciados* (AnA; AnB; AnC; AnD; AnE). Se divide la longitud total en seis partes iguales y se miden los anchos en esos cinco puntos. El *a* es el más cercano a la cabeza y el *e* a la cola.

Combinando variables de ambas fotos:

19. *Volumen del filete* (VF). Calculada como $[(\text{Área Filete} \cdot \text{Ancho Máximo}) \cdot 4^{-1}]$.

Para mantener en buenas condiciones a los peces sacrificados, durante el muestreo, se mantuvieron siempre a baja temperatura, ya sea en hielo, en cámara de refrigeración a 4°C o a -20°C los filetes.

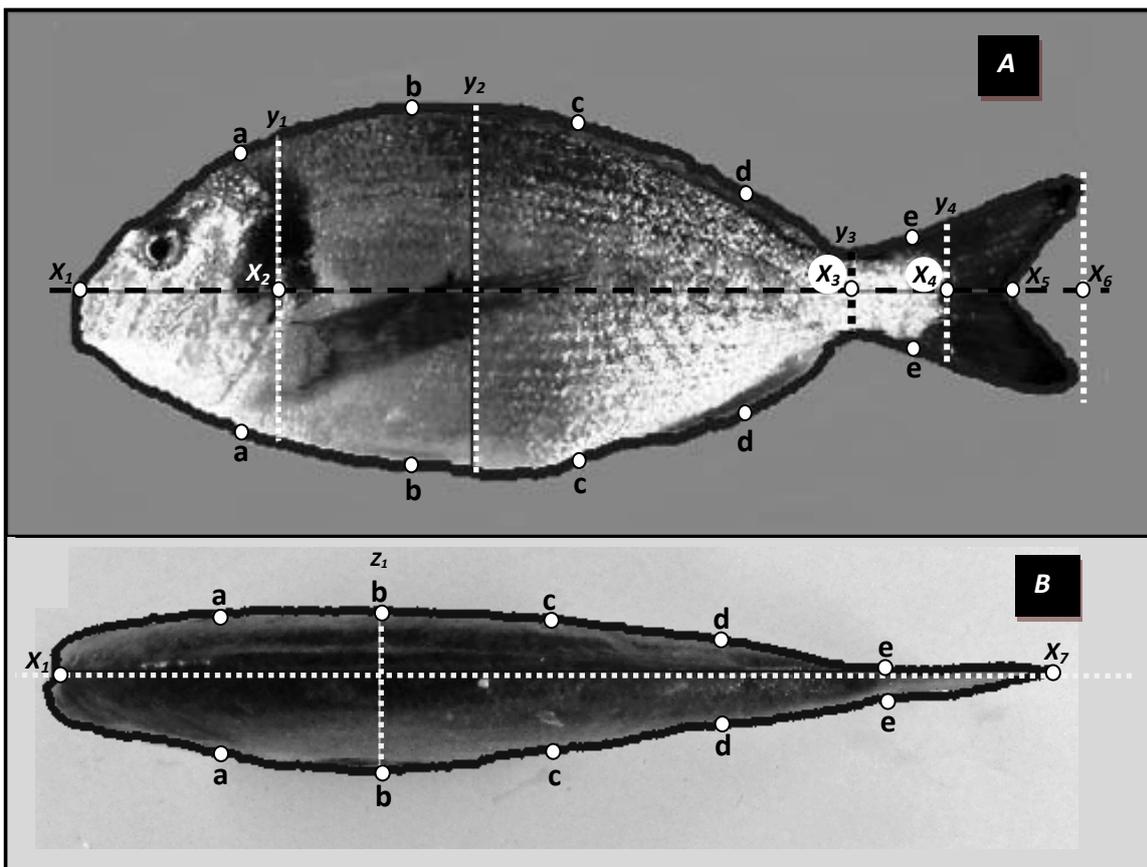


Figura 3.3 Caracteres de análisis de imagen, realizadas por el programa automatizado para imágenes de dorada. A) Vista Lateral: $x_1, x_2, x_3, x_4, x_5, x_6$ puntos del eje longitudinal; *a, b, c, d, e* son medias estandarizadas de alto; y_1, y_2, y_3, y_4 son ejes dirección vientre-lomo; B) Vista Dorsal: x_1, x_7 puntos del eje longitudinal; *a, b, c, d, e* son medidas estandarizadas de anchos; z_1 eje de ancho.

3.2.3 Asignación Parental

A partir del tejido de aletas se extrajo el ADN utilizando el kit *DNAeasy* (Qiagen®) siguiendo las recomendaciones del fabricante y se almacenó a -20°C en el tampón provisto por el kit hasta su uso. La calidad y cantidad se determinó usando un espectrofotómetro Nanodrop 1000 v.3.7 (Termo Fisher Scientific®, Wilmington, USA).

Todos los reproductores y sus descendientes analizados se caracterizaron genéticamente mediante la nueva PCR múltiple *SMsa-1* (*SuperMultiplex Sparus aurata*) de 11 marcadores microsatélites desarrollada por Lee-Montero *et al.* (*en prensa*). Los genotipos se determinaron mediante el programa *Gene mapper* v.3.7, usando el kit de bin set creado por estos autores (kit-SMsa1).

Las relaciones familiares entre reproductores y descendientes se determinaron con el método de exclusión mediante el programa VITASSING (v8.2.1), considerando los sexos de los reproductores desconocidos (Vandeputte *et al.*, 2006).

3.2.4 Análisis de Datos

Todos los datos cuantitativos, previamente comprobada su normalidad y su homogeneidad de varianzas, se analizaron mediante una ANOVA de dos vías, para detectar la significación del efecto tanque, estación y origen de los reproductores, en cada punto de muestreo, utilizando el programa estadístico SPSS v.18 (SPSS, Chicago, IL, USA), aplicando el siguiente modelo lineal general (previamente, algunas variables fueron necesarias transformarlas a logaritmo o a arco seno si eran porcentajes):

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

Donde y es el valor fenotípico de los caracteres evaluados, μ es la media de la población, α_i es el origen, β_j es la estación o el tanque, δ_{ij} es la interacción origen y estación o origen y tanque, ε_{ij} es el error del modelo.

En el caso de las variables de deformidades (ausencia/presencia) se analizaron mediante el siguiente modelo log lineal usando el programa SPSS (v 18.0):

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

Donde, $\ln f_{ij}$ = es la frecuencia esperada de la celda ij , μ = es la media de los logaritmos de las frecuencias esperadas, α_i = es el efecto de la categoría i -ésima del factor prevalencia de deformidad, β_j = es el efecto de la categoría j -ésima del factor estación y $\alpha\beta_{ij}$ = es el efecto debido a la interacción de ambos factores.

La correlación directa entre dos variables medidas en el mismo pez, se estimó calculando el coeficiente de correlación de Pearson usando el programa estadístico SPSS v.18.

Las componentes de varianza de todos los caracteres considerados en este estudio para obtener los parámetros genéticos se estimaron por restricción de máxima verosimilitud (REML) utilizando el programa VCE (v 6.0) (Neumaier y Groeneveld, 1998; Groeneveld *et al.*, 2010) mediante el siguiente modelo lineal:

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

Donde y es el valor del carácter observado, β los efectos fijos (tanque, estación, origen y comunidad), u el efecto animal aleatorio y e el error residual.

Las interacciones GxA se estimaron mediante la correlación genética entre los mismos caracteres en todas las instalaciones y a edad de sacrificio (689 dpe) utilizando el programa VCE (v 6.0) (Falconer y Mackay, 1996).

Las magnitudes de las estimas de heredabilidades se establecieron siguiendo la clasificación de Cardellino y Rovira (1987), como bajas (0,05–0,15), medias (0,20–0,40), altas (0,45–0,60), y muy altas (>0,65), mientras que las de las correlaciones siguiendo la clasificación de Navarro *et al.* (2009a) como bajas (0–0,40), medias (0,45–0,55) y altas (0,60–1), independientemente de su signo.

3.3 RESULTADOS

3.3.1 Genotipado y Asignación de Paternidad

Usando la PCR múltiple SMsa1 mediante el método de exclusión y permitiendo dos errores, se obtuvo un 100% de éxito en la asignación parental (cada descendiente fue asignado a un solo padre y una sola madre), de los descendientes del ICCM y de PMAR. El 90% de los descendientes de CSUR se asignó también con éxito, pero el 10% se asignó a dos parejas de reproductores posibles. Sin embargo estos individuos no se excluyeron de los análisis genéticos, ya que se incluyeron en la matriz de parentesco con un solo parental conocido. Después de revisar los genotipos, todos los errores se identificaron como alelos nulos. Los reproductores del ICCM mostraron alelos nulos en los marcadores A5 y D4, los de PMAR en los marcadores C3, D4 y F6 y en los de CSUR en los marcadores C12 y D4.

En cuanto a la contribución, el número de reproductores que contribuyeron en las puestas por lote y sexo (determinado tras la asignación) y el número de familias de hermanos completos y de medios hermanos, se muestran en la Tabla 3.1. Del total de familias de Canarias (83), 47% dieron lugar a un número de descendientes menor de 10; el 47% a un número de descendientes entre 10 y 100 individuos; y sólo el 6% dio lugar a más de 100 individuos. En el caso de las familias de Andalucía (193) el 84,4% fueron familias con menos de 10 individuos y el 17,6% tuvieron un número de descendientes entre 10 y 100, no existiendo ninguna que diera lugar a más de 100 individuos. Para el lote proveniente de Cataluña (21), el 23,9% de ellas tuvieron menos de 10 descendientes, mientras que el 57,1%, dio lugar un número de descendientes entre 10 y 100. El 19% restante, estuvo conformado por familias de más de 100 individuos. En los peces engordados solo en Canarias, contribuyeron 123 reproductores de los tres lotes (67 machos y 56 hembras) y estuvieron representadas 192 familias de hermanos completos y 81 familias de medios hermanos (39 maternas y 42 paternas).

Tabla 3.1. Número de reproductores que contribuyeron, junto a las familias de hermanos completos y medios hermanos por comunidad autónoma.

Ítem	ICCM			CSUR			PMAR			TOTAL
	Total	♂	♀	Total	♂	♀	Total	♂	♀	
Reproductores totales	59	38	21	98	nd	nd	47	21	27	204
Reproductores contribuyeron	50	31	19	78	39	39	11	6	5	139
Familias hermanos completos	83	-	-	193	-	-	21	-	-	297
Familias de medios hermanos	-	16	18	-	31	31	-	5	4	105

nd: no determinado, ♂: machos, ♀: hembras

3.3.2 Resultados Fenotípicos

A continuación se describirán los resultados fenotípicos de crecimiento y deformidades a distintas edades, y a talla de sacrificio caracteres de la canal y rendimiento, caracteres morfológicos a través de imágenes, y caracteres de calidad de la carne.

3.3.2.1 Crecimiento y Deformidad

En la Tabla 3.2 se muestran los resultados fenotípicos de las variables de crecimiento (peso, longitud y factor de condición o compacidad) y de prevalencia de deformidades (columna vertebral, cabeza, opérculo y total) a las edades 179, 269, 389, 539 dpe de los peces criados en Canarias (ICCM y CANEXMAR) y a la edad de sacrificio (689 dpe) de los peces engordados en Canarias, además de los engordados en el resto de empresas (PIMSA, CULTIMAR y SERVICIOS ATUNEROS DEL MEDITERRÁNEO).

En cuanto a las variables de crecimiento, los peces crecieron más rápidamente en las instalaciones del ICCM que en CANEXMAR. A la edad de sacrificio, se observa la misma diferencia significativa para el peso y la longitud entre el ICCM y el resto de las empresas. Entre CANEXMAR y CULTIMAR, sin embargo, no hay diferencias significativas. La compacidad presenta un patrón un poco distinto, los valores del ICCM y de CULTIMAR no presentan diferencias significativas, al igual que entre CANEXMAR y PIMSA.

En cuanto a deformidades a partir de los datos de las 5 estaciones la prevalencia total al sacrificio fue de 23,6%. De las tres deformidades medidas, la mayor prevalencia se observó en la deformidad de columna (15,3%) y la menor prevalencia en la de cabeza (3,7%). Las prevalencias de deformidades en la columna vertebral no mostraron diferencias significativas entre ICCM y CULTIMAR ni entre CANEXMAR y SERVICIOS ATUNEROS DEL MEDITERRÁNEO, siendo los datos de PIMSA los mayores y más distintos al resto (19,8%). En la prevalencia de deformidades de cabeza el ICCM presentó el menor valor (1,4%) mientras que CANEXMAR el mayor (7,7%), las demás empresas no presentaron diferencias significativas. Para la deformidad de opérculo los peces de PIMSA presentaron la mayor prevalencia (9%). En Canarias, durante el crecimiento, la prevalencia siempre fue mayor en tanques (ICCM) que en la jaula (CANEXMAR), y en general, fue menor a edades más tempranas, a excepción de la deformidad de opérculo que fue mayor.

En cuanto a la deformidad de opérculo se calculó la *Tasa de Recuperación de Opérculo* en 469 individuos a los que se les hizo el seguimiento a todas las edades (179, 269, 389, 539 y 689 dpe). La prevalencia de deformidad de opérculo en cada una de las cinco edades, en estos 469 peces, fue cada vez menor: 14,7% (179 dpe), 10,9% (269 dpe), 8,3% (389 dpe), 7,9% (539 dpe) y 5,8% (689 dpe). En el primer muestreo un 1,1% no se detectó. A partir de los 269 dpe, no se encontró ningún pez con opérculo que no lo presentara en el muestreo anterior. Considerando la diferencia en el número de individuos afectados por esta deformidad entre todas las edades y la edad inicial, se calculó la tasa de

Resultados

recuperación progresivamente: a los 269 dpe el 31,1% de los peces que presentaban deformidad del opérculo a los 179 dpe se habían recuperado, a los 389 dpe el 47,3%, a los 539 dpe el 50% y finalmente a los 689 dpe el 63,5%, siempre comparados con la prevalencia inicial a 179 dpe. Del mismo modo el 55% de los peces que con deformidad de opérculo a la edad de 269 dpe lo recuperaron a los 689 dpe.

Tabla 3.2 Peso, longitud furcal, factor de condición (media \pm error típico) y prevalencia de deformidades (%) de columna vertebral, cabeza, opérculo y total, a diferentes edades y estaciones de cría y engorde, en dorada.

Edad (días post eclosión)	Peso (g)	Longitud Furcal (cm)	Factor de Condición (g cm ⁻³)	Deformidades			
				Columna Vertebral (%)	Cabeza (%)	Opérculo (%)	Deformidad Total (%)
179 dpe	15,77 \pm 0,14	9,05 \pm 0,03	2,00 \pm 0,01	0,9	0,3	13,5	14,7
269 dpe							
ICCM	62,06 \pm 0,89	14,13 \pm 0,08	2,06 \pm 0,01	5,8	0,4	11,5	17,1
Canexmar	-	-	-	-	-	-	-
389 dpe							
ICCM	194,41 \pm 1,31 ^a	20,47 \pm 0,07 ^a	2,17 \pm 0,01 ^a	10,7 ^a	0,4 ^a	9,4 ^a	19,3 ^a
Canexmar	113,90 \pm 2,46 ^b	17,38 \pm 0,13 ^b	2,07 \pm 0,02 ^b	2,3 ^b	0,8 ^a	11 ^a	14,1 ^a
539 dpe							
ICCM	456,29 \pm 2,90 ^a	27,26 \pm 0,08 ^a	2,20 \pm 0,01 ^a	12,9 ^a	1,0 ^a	8,4 ^a	20,9 ^a
Canexmar	201,03 \pm 2,60 ^b	21,25 \pm 0,07 ^b	2,00 \pm 0,01 ^b	2,4 ^b	1,2 ^a	8,1 ^a	11,7 ^b
689 dpe (sacrificio)							
ICCM	717,21 \pm 4,57 ^a	31,44 \pm 0,10 ^a	2,27 \pm 0,01 ^a	14,5 ^a	1,4 ^a	6,0 ^a	21,5 ^a
Canexmar	326,32 \pm 5,19 ^b	24,38 \pm 0,11 ^b	2,18 \pm 0,01 ^b	9,0 ^b	7,7 ^c	6,6 ^a	21,4 ^a
PIMSA	352,65 \pm 3,02 ^c	25,37 \pm 0,06 ^c	2,14 \pm 0,01 ^b	19,8 ^c	3,3 ^b	9,0 ^b	28,3 ^b
Cultimar	321,69 \pm 3,88 ^b	24,10 \pm 0,09 ^d	2,26 \pm 0,01 ^a	12,9 ^a	2,2 ^b	5,1 ^a	18,4 ^c
Atuneros	231,59 \pm 3,33 ^d	21,77 \pm 0,07 ^e	2,21 \pm 0,01 ^c	12,8 ^b	4,6 ^b	5,2 ^a	21,9 ^a
Total							
deformidades a sacrificio	-	-	-	15,3	3,7	6,8	23,6

Letras diferentes entre estaciones en cada edad, indican diferencias significativas (P \leq 0,05)

3.3.2.2 Caracteres de la Canal (peso canal, peso filete, rendimiento canal, rendimiento filete, grasa visceral y porcentaje de grasa visceral)

En la Tabla 3.3 se muestran los datos fenotípicos de las variables de la canal a edad de sacrificio en Canarias. Se puede observar que todos los resultados presentaron diferencias significativas entre estaciones. En cuanto a la estación los peces engordados en el ICCM presentaron los mayores valores para todas las variables.

Tabla 3.3 Variables de la canal (peso canal, peso filete, grasa visceral, rendimiento canal, rendimiento filete, porcentaje de grasa visceral (media \pm error típico) a edad de sacrificio para dorada, por estación, considerando los datos de los peces engordados en Canarias.

Estación	Peso Canal (g)	Peso Filete (g)	Grasa Visceral (g)	% Canal	% Filete	% Grasa Visceral
ICCM	650,97 \pm 5,97 ^a	273,76 \pm 2,71 ^a	5,92 \pm 0,34 ^a	91,34 \pm 0,32 ^a	37,22 \pm 0,35 ^a	0,75 \pm 0,08 ^a
Canexmar	288,17 \pm 3,71 ^b	121,96 \pm 1,68 ^b	1,82 \pm 0,21 ^b	90,57 \pm 0,20 ^b	37,09 \pm 0,22 ^a	0,51 \pm 0,05 ^b
Media	389,10 \pm 4,23	164,11 \pm 1,85	2,92 \pm 0,18	90,78 \pm 0,17	37,13 \pm 0,19	0,58 \pm 0,04

Letras diferentes entre estación, indican diferencias significativas (P \leq 0,05)

3.3.2.3 Caracteres Morfológicos a través de Análisis de Imágenes

En la Tabla 3.4 se muestran los valores fenotípicos de las 27 variables morfológicas obtenidas tras el análisis de las imágenes. En general los valores de áreas, longitudes y volumen, son mayores en los peces engordados en el ICCM que en CANEXMAR.

Con respecto a la longitud furcal medida en el pez mediante un ictiómetro y medida sobre su foto mediante análisis de imagen, se obtuvo una correlación positiva y significativa entre ambas variables ($R=0,99$, $P<0,01$).

Tabla 3.4 Variables morfológicas de análisis de imágenes (media \pm error típico) a edad de sacrificio en los peces engordados en Canarias, por estación.

Variables	TOTAL	ESTACION	
		ICCM	CANEXMAR
ATD	107,12 \pm 0,96	124,07 \pm 1,60 ^a	90,17 \pm 1,05 ^b
LTD	31,90 \pm 0,16	34,05 \pm 0,27 ^a	29,76 \pm 0,18 ^b
AnM	5,27 \pm 0,03	5,71 \pm 0,05 ^a	4,83 \pm 0,03 ^b
AnA	2,71 \pm 0,02	1,28 \pm 0,04 ^a	4,13 \pm 0,02 ^b
AnB	3,87 \pm 0,03	3,03 \pm 0,05 ^a	4,70 \pm 0,03 ^b
AnC	4,17 \pm 0,03	4,53 \pm 0,04 ^a	3,81 \pm 0,03 ^b
AnD	3,98 \pm 0,02	5,60 \pm 0,04 ^a	2,37 \pm 0,02 ^b
AnE	2,77 \pm 0,02	4,73 \pm 0,03 ^a	0,81 \pm 0,02 ^b
ATL	226,00 \pm 1,17	284,51 \pm 1,95 ^a	167,48 \pm 1,28 ^b
LTL	30,61 \pm 0,09	34,11 \pm 0,15 ^a	27,10 \pm 0,10 ^b
AIM	11,26 \pm 0,04	12,83 \pm 0,06 ^a	9,68 \pm 0,04 ^b
AIPC	2,67 \pm 0,01	3,04 \pm 0,02 ^a	2,29 \pm 0,01 ^b
LSC	23,49 \pm 0,07	26,56 \pm 0,12 ^a	20,43 \pm 0,08 ^b
AICa	9,90 \pm 0,03	11,23 \pm 0,05 ^a	8,57 \pm 0,03 ^b
AF	152,24 \pm 0,85	193,77 \pm 1,42 ^a	110,72 \pm 0,93 ^b
%AF	66,88 \pm 0,12	67,89 \pm 0,20 ^a	65,87 \pm 0,13 ^b
LS	26,33 \pm 0,08	29,75 \pm 0,14 ^a	22,92 \pm 0,09 ^b
LMF	16,54 \pm 0,06	18,77 \pm 0,10 ^a	14,31 \pm 0,06 ^b
LF	28,43 \pm 0,08	31,90 \pm 0,14 ^a	24,95 \pm 0,09 ^b
ExP	0,88 \pm 0,00	0,88 \pm 0,00 ^a	0,88 \pm 0,00 ^b
ExCa	0,71 \pm 0,00	0,70 \pm 0,00 ^a	0,73 \pm 0,00 ^b
AIA	8,70 \pm 0,03	9,86 \pm 0,04 ^a	7,53 \pm 0,03 ^b
AIB	11,09 \pm 0,04	12,63 \pm 0,06 ^a	9,55 \pm 0,04 ^b
AIC	10,05 \pm 0,04	11,63 \pm 0,06 ^a	8,47 \pm 0,04 ^b
AID	6,60 \pm 0,03	7,99 \pm 0,05 ^a	5,21 \pm 0,04 ^b
AIE	3,70 \pm 0,02	4,03 \pm 0,03 ^a	3,38 \pm 0,02 ^{bc}
VF	209,71 \pm 2,16	281,98 \pm 3,61 ^a	137,44 \pm 2,37 ^b

ATD= Área total dorsal, LTD= Longitud Total Dorsal, AnM= Ancho Máximo, AnA= Ancho A, AnB= Ancho B, AnC= Ancho C, AnD= Ancho D, AnE= Ancho E, ATL =Área Total lateral, LTL= Longitud Total lateral, AIM= Alto Máximo, AIPC= Alto Pedúnculo Caudal, LSC= Longitud sin Cola, AICa= Alto Cabeza, AF= Área Filete, %AF= %Área Filete, LS= Longitud Estándar, LMF= Longitud Máximo Filete, AIMF= Alto Máximo Filete, LF= Longitud Furcal, ExP= Excentricidad Pez, ExCa= Excentricidad Cabeza, AIA= Alto A, AIB= Alto B, AIC= Alto C, AID= Alto D, AIE= Alto E, VF= Volumen Filete. Unidades de variables de longitud, anchos y altos: cm, de áreas: cm², de volumen: cm³. Letras diferentes entre estaciones, indican diferencias significativas ($P\leq 0,05$)

3.3.2.4 Caracteres de Composición de la Carne

Los valores de las variables de composición de la carne y de textura se muestran en la Tabla 3.5. Se puede observar que entre estaciones sólo existen diferencias significativas para porcentaje de proteínas.

Con respecto al porcentaje de lípidos en el músculo medido mediante el método NIR y el FF, se obtuvo una correlación positiva y significativa entre ambas variables ($R=0,40$, $P<0,01$).

Tabla 3.5 Variables de calidad (media \pm error típico) a edad de sacrificio en Canarias, por estación: composición de la carne: colágeno, humedad, proteína, lípidos y *Fish Fatmeter* (FF) y fuerza máxima como variable de textura.

Estación	COMPOSICION DE LA CARNE					TEXTURA
	Colágeno (%)	Humedad (%)	Proteína (%)	Lípidos (%)	FF (%)	Fuerza Máxima (kg)
ICCM	2,19 \pm 0,06 ^a	71,71 \pm 0,13 ^a	24,64 \pm 0,12 ^a	5,21 \pm 0,12 ^a	NM	8,59 \pm 0,12 ^a
Canexmar	2,48 \pm 0,04 ^a	71,92 \pm 0,08 ^a	23,88 \pm 0,07 ^b	5,08 \pm 0,08 ^a	10,27 \pm 0,12	8,97 \pm 0,08 ^a
Promedio Canarias	2,40 \pm 0,03	71,86 \pm 0,07	24,09 \pm 0,06	5,12 \pm 0,07	-	8,86 \pm 0,07

Letras diferentes entre estaciones, indican diferencias significativas ($P\leq 0,05$); NM: no medido.

3.3.3 Heredabilidades y Correlaciones

3.3.3.1 Crecimiento y Deformidad

Las correlaciones genéticas y fenotípicas entre caracteres de crecimiento y deformidad general (prevalencia de cualquier tipo de deformidad) a las edades de 179, 269, 389, 539 y 689 dpe, a partir de los datos de los peces criados en Canarias (ICCM y CANEXMAR), y sus heredabilidades se muestran en la Tabla 3.6. En cuanto a las variables de crecimiento, como se puede observar, las heredabilidades estuvieron comprendidas entre 0,16 y 0,48 para el peso, entre 0,20 y 0,41 para la longitud y entre 0,17 y 0,43 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 0,94 y 0,99 para las correlaciones genéticas, y entre 0,80 y 0,84 para las correlaciones fenotípicas. Las correlaciones entre pesos y entre longitudes fueron altas, medias y bajas entre edades, pues dichas estimas decrecieron en magnitud a medida que incrementó la diferencia entre las edades. 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 cuanto a la deformidad, las heredabilidades a las distintas edades estuvieron entre 0,07 y 0,26. La correlación genética de las deformidades con las variables de crecimiento en cada edad fueron de valores bajos a edad de 179 dpe, a valores medios y altos a edades comprendidas entre 269 y 539 dpe, siendo en edad de sacrificio correlaciones no distintas a cero con peso y longitud y alta con compacidad.

Tabla 3.6 Heredabilidades (en la diagonal y en negrita, con \pm error típico), correlaciones genéticas (en cursiva encima de la diagonal, con \pm error típico) y correlaciones fenotípicas (debajo de la diagonal) entre peso, longitud (Long), compacidad (FC) y deformidad (Def) a diferentes edades (días post eclosión) a partir de los datos de los peces criados en Canarias.

	Peso ₁₇₉	Long ₁₇₉	FC ₁₇₉	Def ₁₇₉	Peso ₂₆₉	Long ₂₆₉	FC ₂₆₉	Def ₂₆₉	Peso ₃₈₉	Long ₃₈₉	FC ₃₈₉	Def ₃₈₉	Peso ₅₃₉	Long ₅₃₉	FC ₅₃₉	Def ₅₃₉	Peso ₆₈₉	Long ₆₈₉	FC ₆₈₉	Def ₆₈₉
Peso ₁₇₉	0,16 ±0,05	0,99 <i>±0,01</i>	0,22 <i>±0,23</i>	0,17 <i>±0,21</i>	0,81 <i>±0,11</i>	0,72 <i>±0,14</i>	0,81 <i>±0,13</i>	0,40 <i>±0,26</i>	0,45 <i>±0,18</i>	0,37 <i>±0,20</i>	0,52 <i>±0,17</i>	0,44 <i>±0,24</i>	0,31 <i>±0,19</i>	0,25 <i>±0,21</i>	0,42 <i>±0,18</i>	0,33 <i>±0,20</i>	0,31 <i>±0,21</i>	0,27 <i>±0,24</i>	0,53 <i>±0,24</i>	0,72 <i>±0,30</i>
Long ₁₇₉	0,94	0,20 ±0,06	0,10 <i>±0,21</i>	0,08 <i>±0,19</i>	0,76 <i>±0,11</i>	0,79 <i>±0,09</i>	0,67 <i>±0,15</i>	0,30 <i>±0,26</i>	0,42 <i>±0,16</i>	0,40 <i>±0,20</i>	0,43 <i>±0,18</i>	0,42 <i>±0,22</i>	0,29 <i>±0,19</i>	0,25 <i>±0,20</i>	0,12 <i>±0,21</i>	0,33 <i>±0,21</i>	0,32 <i>±0,22</i>	0,20 <i>±0,21</i>	0,42 <i>±0,24</i>	0,73 <i>±0,18</i>
FC ₁₇₉	0,35	0,12	0,17 ±0,06	0,25 <i>±0,27</i>	0,37 <i>±0,14</i>	0,30 <i>±0,20</i>	0,82 <i>±0,14</i>	0,50 <i>±0,22</i>	0,37 <i>±0,11</i>	0,10 <i>±0,27</i>	0,81 <i>±0,15</i>	0,21 <i>±0,12</i>	0,28 <i>±0,23</i>	0,05 <i>±0,28</i>	0,82 <i>±0,10</i>	0,30 <i>±0,26</i>	0,29 <i>±0,23</i>	0,28 <i>±0,23</i>	0,76 <i>±0,15</i>	0,22 <i>±0,29</i>
Def ₁₇₉	-0,1	-0,1	0,04	0,07 ±0,03	0,27 <i>±0,25</i>	0,27 <i>±0,17</i>	0,36 <i>±0,25</i>	0,88 <i>±0,14</i>	0,17 <i>±0,12</i>	-0,09 <i>±0,32</i>	0,57 <i>±0,19</i>	0,92 <i>±0,08</i>	0,31 <i>±0,24</i>	0,12 <i>±0,28</i>	0,39 <i>±0,27</i>	0,98 <i>±0,04</i>	0,22 <i>±0,12</i>	0,06 <i>±0,31</i>	0,42 <i>±0,27</i>	0,83 <i>±0,08</i>
Peso ₂₆₉	0,83	0,8	0,32	-0,07	0,24 ±0,07	0,97 <i>±0,02</i>	0,85 <i>±0,11</i>	0,43 <i>±0,26</i>	0,78 <i>±0,10</i>	0,77 <i>±0,12</i>	0,70 <i>±0,15</i>	0,54 <i>±0,20</i>	0,79 <i>±0,11</i>	0,58 <i>±0,21</i>	0,52 <i>±0,17</i>	0,84 <i>±0,19</i>	0,84 <i>±0,12</i>	0,52 <i>±0,20</i>	0,75 <i>±0,18</i>	0,57 <i>±0,20</i>
Long ₂₆₉	0,76	0,78	0,29	-0,06	0,95	0,27 ±0,09	0,74 <i>±0,21</i>	0,42 <i>±0,30</i>	0,78 <i>±0,09</i>	0,67 <i>±0,14</i>	0,70 <i>±0,13</i>	0,57 <i>±0,22</i>	0,82 <i>±0,09</i>	0,68 <i>±0,20</i>	0,49 <i>±0,23</i>	0,46 <i>±0,21</i>	0,80 <i>±0,13</i>	0,53 <i>±0,20</i>	0,60 <i>±0,25</i>	0,57 <i>±0,22</i>
FC ₂₆₉	0,38	0,34	0,42	0,04	0,56	0,35	0,33 ±0,11	0,79 <i>±0,13</i>	0,83 <i>±0,11</i>	0,75 <i>±0,16</i>	0,98 <i>±0,04</i>	0,78 <i>±0,16</i>	0,56 <i>±0,16</i>	0,47 <i>±0,17</i>	0,77 <i>±0,22</i>	0,52 <i>±0,18</i>	0,67 <i>±0,22</i>	0,61 <i>±0,17</i>	0,87 <i>±0,16</i>	0,72 <i>±0,20</i>
Def ₂₆₉	-0,07	-0,08	0,11	0,52	-0,07	-0,06	0,13	0,26 ±0,09	0,39 <i>±0,16</i>	0,18 <i>±0,28</i>	0,76 <i>±0,18</i>	0,99 <i>±0,03</i>	0,49 <i>±0,22</i>	-0,12 <i>±0,35</i>	0,39 <i>±0,36</i>	0,98 <i>±0,01</i>	-0,19 <i>±0,33</i>	-0,33 <i>±0,30</i>	0,67 <i>±0,20</i>	0,99 <i>±0,08</i>
Peso ₃₈₉	0,6	0,6	0,27	-0,05	0,84	0,84	0,46	-0,06	0,34 ±0,09	0,96 <i>±0,02</i>	0,77 <i>±0,10</i>	0,54 <i>±0,15</i>	0,81 <i>±0,10</i>	0,74 <i>±0,13</i>	0,68 <i>±0,14</i>	0,43 <i>±0,14</i>	0,95 <i>±0,04</i>	0,83 <i>±0,09</i>	0,64 <i>±0,18</i>	0,46 <i>±0,23</i>
Long ₃₈₉	0,52	0,56	0,14	-0,07	0,78	0,84	0,33	-0,09	0,92	0,38 ±0,11	0,71 <i>±0,13</i>	0,44 <i>±0,21</i>	0,88 <i>±0,07</i>	0,78 <i>±0,11</i>	0,62 <i>±0,14</i>	0,40 <i>±0,19</i>	0,96 <i>±0,04</i>	0,91 <i>±0,07</i>	0,29 <i>±0,31</i>	0,38 <i>±0,20</i>
FC ₃₈₉	0,21	0,16	0,34	0,11	0,32	0,28	0,61	0,18	0,44	0,2	0,43 ±0,11	0,66 <i>±0,18</i>	0,66 <i>±0,11</i>	0,50 <i>±0,16</i>	0,63 <i>±0,15</i>	0,61 <i>±0,15</i>	0,66 <i>±0,14</i>	0,58 <i>±0,15</i>	0,86 <i>±0,13</i>	0,78 <i>±0,15</i>
Def ₃₈₉	-0,03	-0,03	0,09	0,4	-0,00	-0,01	0,19	0,57	0,01	-0,04	0,3	0,26 ±0,06	0,34 <i>±0,18</i>	0,22 <i>±0,28</i>	0,33 <i>±0,14</i>	0,97 <i>±0,04</i>	-0,10 <i>±0,29</i>	-0,27 <i>±0,29</i>	0,65 <i>±0,22</i>	0,94 <i>±0,09</i>
Peso ₅₃₉	0,35	0,37	0,19	0,01	0,63	0,65	0,41	0,01	0,77	0,82	0,44	0,05	0,48 ±0,10	0,94 <i>±0,03</i>	0,63 <i>±0,14</i>	0,55 <i>±0,16</i>	0,93 <i>±0,04</i>	0,89 <i>±0,07</i>	0,47 <i>±0,15</i>	0,39 <i>±0,22</i>
Long ₅₃₉	0,35	0,38	0,06	-0,01	0,57	0,65	0,26	-0,11	0,73	0,81	0,25	-0,03	0,94	0,41 ±0,10	0,36 <i>±0,21</i>	0,46 <i>±0,19</i>	0,94 <i>±0,04</i>	0,96 <i>±0,03</i>	0,17 <i>±0,17</i>	0,31 <i>±0,24</i>
FC ₅₃₉	0,14	0,05	0,31	0,02	0,15	0,09	0,44	0,11	0,23	0,12	0,51	0,21	0,51	0,2	0,42 ±0,10	0,59 <i>±0,15</i>	0,72 <i>±0,15</i>	0,63 <i>±0,16</i>	0,75 <i>±0,15</i>	0,43 <i>±0,16</i>
Def ₅₃₉	-0,06	-0,06	0,06	0,43	-0,03	-0,05	0,14	0,48	-0,02	-0,04	0,22	0,64	0,07	-0,00	0,2	0,25 ±0,07	0,28 <i>±0,12</i>	0,15 <i>±0,17</i>	0,67 <i>±0,19</i>	0,99 <i>±0,01</i>
Peso ₆₈₉	0,32	0,32	0,17	-0,06	0,52	0,5	0,31	-0,12	0,68	0,7	0,3	-0,1	0,85	0,84	0,26	-0,04	0,43 ±0,10	0,98 <i>±0,01</i>	0,64 <i>±0,15</i>	0,42 <i>±0,16</i>
Long ₆₈₉	0,32	0,34	0,1	-0,1	0,46	0,51	0,17	-0,2	0,65	0,73	0,16	-0,16	0,81	0,85	0,11	-0,14	0,93	0,40 ±0,09	0,44 <i>±0,18</i>	0,35 <i>±0,20</i>
FC ₆₈₉	0,00	-0,05	0,22	0,08	0,04	-0,04	0,29	0,16	0,09	-0,03	0,35	0,13	0,2	0,04	0,35	0,21	0,45	0,11	0,20 ±0,05	0,51 <i>±0,11</i>
Def ₆₈₉	-0,03	-0,03	0,06	0,38	-0,00	-0,01	0,19	0,65	-0,01	-0,05	0,25	0,63	-0,00	-0,07	0,22	0,86	0,00	-0,05	0,13	0,17 ±0,05

Resultados

Sin embargo, hay que tener en consideración que los errores de estas correlaciones son altos. Sus correlaciones fenotípicas, en cambio, con peso y longitud en cada edad y entre edades fueron negativas y cercanas a cero y con la compacidad fueron bajas, pero positivas.

En la Tabla 3.7 se muestra las heredabilidades estimadas para cada tipo de deformidad en cada edad, considerando también sólo los datos de los peces criados en Canarias. Las heredabilidades a la edad de los 179 dpe, en general son bajas excepto para la deformidad de columna la cual además presenta un error muy alto. A edades intermedias de 269, 389 y 539 dpe es cuando se encuentran los mayores valores generales volviendo a bajar a los 689 dpe. La deformidad que presenta mayor variación genética aditiva es la de columna, llegando a los 0,41 a los 539 dpe. Las deformidades de cabeza presentan en todas las edades heredabilidades no distintas de cero y la deformidad de opérculo heredabilidades bajas.

Tabla 3.7 Heredabilidades (con \pm error típico) para cada tipo de deformidades de dorada estimadas en diferentes edades considerando sólo los datos de Canarias (ICCM y CANEXMAR).

Deformidad	179 dpe	269 dpe	389 dpe	539 dpe	689 dpe
Columna	0,60 \pm 0,32	0,22 \pm 0,15	0,40 \pm 0,12	0,41 \pm 0,13	0,16 \pm 0,06
Opérculo	0,06 \pm 0,03	0,09 \pm 0,05	0,08 \pm 0,04	0,11 \pm 0,04	0,08 \pm 0,04
Cabeza	0,00 \pm 0,01	0,05 \pm 0,04	0,01 \pm 0,02	0,01 \pm 0,01	0,00 \pm 0,01
General	0,07 \pm 0,03	0,26 \pm 0,09	0,26 \pm 0,06	0,25 \pm 0,07	0,17 \pm 0,05

dpe: días post eclosión

En la Tabla 3.8 se muestran las correlaciones genéticas y fenotípicas entre peso, longitud, compacidad y deformidad general (prevalencia de cualquier tipo de deformidad) y sus heredabilidades a la edad de sacrificio, estimadas a partir de los datos de los peces engordados en las cinco estaciones estudiadas (ICCM, CANEXMAR, PIMSA, CULTIMAR y SERVICIOS ATUNEROS DEL MEDITERRÁNEO). Como se puede observar las heredabilidades de las cuatro variables son medias pero menores a las obtenidas sólo con los datos de Canarias (Tabla 3.6), pero con errores típicos menores. Las correlaciones genéticas y fenotípicas presentan un comportamiento similar a las observadas en la Tabla 3.6.

Tabla 3.8. Heredabilidades (en la diagonal y en negrita, con \pm error típico), correlaciones genéticas (en cursiva encima de la diagonal, con \pm error típico) y correlaciones fenotípicas (debajo de la diagonal) entre peso, longitud (Long), compacidad (FC) y deformidad (Def) para dorada a 689 dpe estimadas a partir de los datos de los peces engordados en cinco estaciones (ICCM, CANEXMAR, PIMSA, CULTIMAR y SERVICIOS ATUNEROS DEL MEDITERRÁNEO).

689 dpe	Peso	Long	FC	Def
Peso	0,29 \pm 0,06	<i>0,92 \pm 0,03</i>	<i>0,40 \pm 0,14</i>	<i>0,19 \pm 0,17</i>
Long	0,90	0,27 \pm 0,06	<i>0,01 \pm 0,11</i>	<i>0,18 \pm 0,17</i>
FC	0,34	-0,10	0,21 \pm 0,04	<i>0,49 \pm 0,14</i>
Def	-0,03	-0,12	0,16	0,16 \pm 0,04

dpe: Días post eclosión

3.3.3.2 Caracteres de la Canal y Morfológicos con Análisis de Imágenes

Las correlaciones genéticas y fenotípicas entre caracteres de crecimiento, de la canal, deformidades y morfológicas de análisis de imágenes a edad de sacrificio (689 dpe), y sus heredabilidades se muestran en la Tabla 3.9. Se seleccionaron 11 de las 27 variables morfológicas medidas, por considerarlas más relevantes y representativas. Respecto a las heredabilidades, para las variables de los caracteres de la canal estuvieron comprendidas entre 0,06 y 0,45, para las variables de morfología entre 0,17 y 0,51, las de crecimiento y deformidades fueron descritas previamente en las tablas 3.6 y 3.7 respectivamente. El peso canal y el peso filete presentaron correlaciones fenotípicas y genéticas altas y positivas con los caracteres de crecimiento. Para el rendimiento canal las correlaciones genéticas con los caracteres de peso, longitud, compacidad, peso canal y peso filete, fueron esencialmente poco consistentes por presentar grandes errores típicos y las correlaciones fenotípicas fueron bajas. Las correlaciones genéticas de rendimiento filete con estas mismas variables fueron positivas y altas (a excepción del rendimiento canal que fue negativa) y las fenotípicas, en general, bajas y medias. Las correlaciones genéticas y fenotípicas del % grasa visceral con las de peso, longitud, peso canal, peso filete y rendimiento de filete fueron medias y positivas, en cambio con rendimiento canal fue media y negativa, y las fenotípicas bajas. Las correlaciones genéticas entre la deformidad de columna y el resto de caracteres, éstas fueron, en general, medias y positivas. Las correlaciones de deformidad de cabeza presentaron errores altos y fueron poco consistentes, mientras que las correlaciones de las deformidades totales presentaron el mismo esquema que la deformidad de columna, aunque con una correlación baja y negativa con la deformidad de cabeza. En general, las correlaciones fenotípicas de los tres tipos de deformidades con las variables de crecimiento y rendimiento, fueron bajas. Respecto a las variables de morfología las correlaciones genéticas y fenotípicas entre éstas y las de crecimiento y canal fueron, en general, altas y positivas. Las correlaciones genéticas entre las variables de deformidades con las de morfología presentaron, en general, valores medios y positivos, mientras que bajos y negativos con las variables de excentricidad. Las correlaciones fenotípicas entre deformidades y variables morfológicas son bajas, cercanas a cero. Entre las correlaciones de las doce variables de morfología observamos valores altos y positivos, con errores pequeños, las correlaciones fenotípicas en general presentan el mismo patrón pero con valores algo menores.

3.3.3.3 Caracteres de Composición de la Carne

Las correlaciones genéticas y fenotípicas entre caracteres de calidad, junto con la de longitud como variable representativa del crecimiento según Navarro *et al.* (2009a) y de las de rendimiento a la edad de sacrificio (689 dpe), y sus heredabilidades se muestran en la Tabla 3.10.

Respecto a las heredabilidades, las estimas estuvieron comprendidas entre 0,01 (colágeno) y 0,45 (FF). En cuanto a las correlaciones genéticas entre la longitud, el rendimiento filete y el % de grasa visceral versus los caracteres de calidad de la carne se observan correlaciones medias-altas y positivas a excepción de las obtenidas con lípidos y fuerza máxima que fueron negativas. En general, las correlaciones genéticas de rendimiento canal fueron medias y con errores altos. El FF presentó correlaciones altas, positiva con lípidos y negativas con la humedad y fuerza máxima. El colágeno presentó correlaciones genéticas altas pero con errores típicos también altos. Los lípidos presentaron una correlación alta y negativa con la humedad. Las correlaciones de la fuerza máxima fueron, en general, altas y negativas, excepto con la humedad. En general las correlaciones fenotípicas fueron medias a bajas.

Tabla 3.10 Heredabilidades (en la diagonal y en negrita, con \pm error típico), correlaciones genéticas (en cursiva encima de la diagonal, con \pm error típico) y correlaciones fenotípicas (debajo de la diagonal) entre variables de longitud (Long), rendimiento canal (% Canal), rendimiento filete (% Filete), porcentaje de grasa visceral (% GV), *Fish Fatmeter* (FF), colágeno, lípidos, humedad, proteína, fuerza máxima (F Máx.), a edad de sacrificio (689 dpe), a partir de los datos de los peces engordados en Canarias.

	Long	% Canal	% Filete	% GV	FF	Colágeno	Lípidos	Humedad	Proteína	F Máx.
Long	0,40 $\pm 0,09$	-0,39 $\pm 0,28$	0,79 $\pm 0,12$	0,52 $\pm 0,14$	0,65 $\pm 0,12$	0,84 $\pm 0,56$	0,24 $\pm 0,23$	-0,64 $\pm 0,17$	0,75 $\pm 0,17$	-0,52 $\pm 0,19$
% Canal	0,11	0,06 $\pm 0,03$	-0,53 $\pm 0,34$	-0,43 $\pm 0,22$	0,04 $\pm 0,29$	-0,25 $\pm 0,77$	-0,19 $\pm 0,28$	0,20 $\pm 0,30$	-0,15 $\pm 0,36$	0,23 $\pm 0,26$
% Filete	0,38	0,26	0,08 $\pm 0,03$	0,47 $\pm 0,20$	0,51 $\pm 0,20$	0,26 $\pm 0,70$	0,34 $\pm 0,28$	-0,90 $\pm 0,09$	0,99 $\pm 0,01$	-0,83 $\pm 0,22$
%GV	0,32	-0,04	0,18	0,29 $\pm 0,06$	0,30 $\pm 0,09$	-0,03 $\pm 1,85$	0,52 $\pm 0,14$	-0,49 $\pm 0,17$	0,02 $\pm 0,23$	-0,35 $\pm 0,09$
FF	0,53	0,10	0,37	0,22	0,45 $\pm 0,11$	-0,04 $\pm 0,88$	0,99 $\pm 0,05$	-0,75 $\pm 0,13$	0,30 $\pm 0,30$	-0,70 $\pm 0,14$
Colágeno	0,01	0,10	0,10	0,04	0,00	0,01 $\pm 0,01$	-0,54 $\pm 0,80$	0,80 $\pm 0,50$	0,96 $\pm 0,29$	-0,99 $\pm 0,10$
Lípidos	0,05	0,00	0,14	0,12	0,33	-0,12	0,20 $\pm 0,08$	-0,99 $\pm 0,02$	-0,96 $\pm 0,27$	-0,82 $\pm 0,24$
Humedad	-0,25	-0,12	-0,39	-0,23	-0,55	-0,45	-0,51	0,17 $\pm 0,06$	-0,70 $\pm 0,50$	0,92 $\pm 0,24$
Proteína	0,23	0,11	0,26	0,12	0,54	0,75	-0,23	-0,50	0,06 $\pm 0,04$	-0,87 $\pm 0,21$
F Máx.	-0,10	0,08	-0,12	-0,14	-0,47	0,04	-0,16	0,20	-0,05	0,17 $\pm 0,05$

3.3.4 Interacción Genotipo – Ambiente

3.3.4.1 Interacción Genotipo-Ambiente para Variables de Crecimiento y Deformidad

Los análisis de interacción GxA para las variables de crecimiento y deformidad general (prevalencia de cualquier tipo de deformidad) a punto de sacrificio se estimaron a partir de los datos de los peces engordados en las cuatro comunidades autónomas entre las cinco estaciones. De las 297 familias de hermanos carnales que formaron los 4255 descendientes, 70 estuvieron representadas en las cinco estaciones, las cuales se utilizaron para los análisis de la interacción GxA. Como se puede observar en la Tabla 3.11 las correlaciones genéticas entre cada carácter medido en todas las estaciones, fueron altas y positivas y variaron entre 0,63 y 0,94 para los caracteres de longitud y entre 0,60 y 0,99 para los de deformidad sugiriendo la inexistencia de interacción GxA entre todas las estaciones de engorde. En la Figura 3.4 se representa el peso medio de estas 70 familias en cada una de las estaciones.

Tabla 3.11 Interacción genotipo-ambiente para caracteres de crecimiento y deformidades a talla de sacrificio entre las cuatro comunidades.

	LONGITUD				DEFORMIDADES			
	CANEXMAR	PIMSA	CULTIMAR	ATUNEROS	CANEXMAR	PIMSA	CULTIMAR	ATUNEROS
ICCM	0,74±0,08	0,69±0,07	0,65±0,07	0,85±0,04	0,96±0,11	0,98±0,21	0,96±0,09	0,60±0,33
CANEXMAR		0,63±0,08	0,86±0,05	0,94±0,02		0,99±0,10	0,87±0,19	0,89±0,27
PIMSA			0,69±0,07	0,80±0,06			0,96±0,16	0,65±0,48
CULTIMAR				0,93±0,03				0,88±0,26

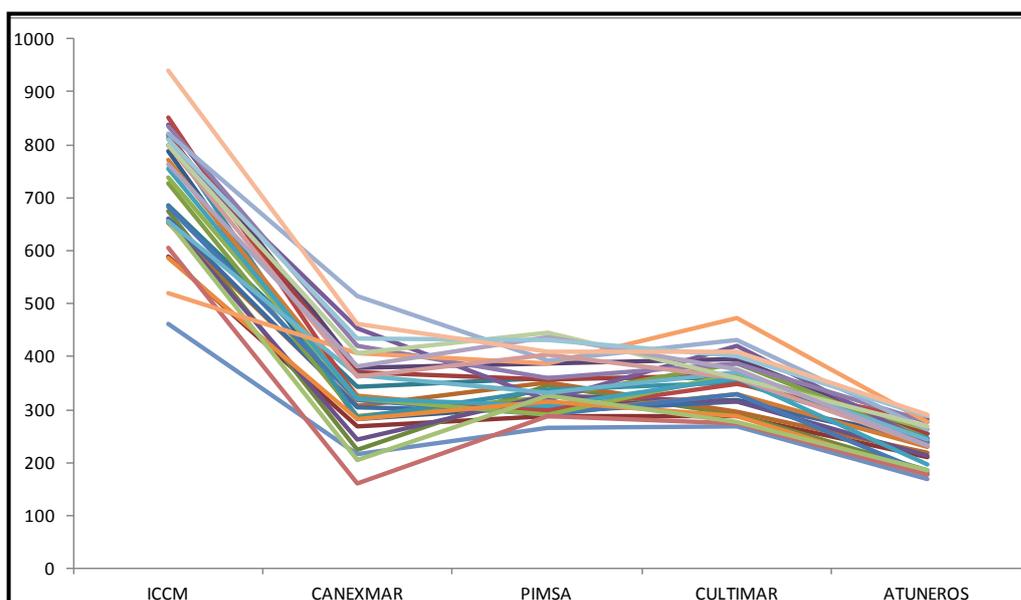


Figura 3.4 Peso medio de las familias representadas en las cinco estaciones estudiadas.

3.3.4.2 Interacción Genotipo-Ambiente para Caracteres de la Canal y de Composición de la Carne

Los análisis de interacción GxA para las variables de canal, morfológicas y de calidad a la edad de sacrificio se estimaron entre las estaciones del ICCM y Canexmar. De las 191 familias de hermanos carnales que formaron los 1630 descendientes engordados en Canarias, 85 estuvieron representadas en ambas estaciones, las cuales se utilizaron para los análisis de la interacción GxA. La Tabla 3.12 muestra las correlaciones genéticas entre cada carácter medido en ambas estaciones, sin considerar las variables con heredabilidades no distintas de cero (rendimiento filete y colágeno) ya que las correlaciones genéticas para análisis de interacción GxA para variables con estos valores, son poco informativas (Navarro *et al.*, 2009b). Como se puede observar, las correlaciones fueron, en general, altas y positivas y variaron entre 0,35 y 0,80.

Tabla 3.12 Interacción genotipo-ambiente para cada carácter, en dorada a talla sacrificio (689 dpe) a través de correlaciones genéticas entre las dos estaciones (\pm error típico).

Carácter	Correlaciones genéticas
Peso canal	0,52 \pm 0,12
Peso filete	0,42 \pm 0,18
Rendimiento canal	0,49 \pm 0,25
Grasa Visceral	0,61 \pm 0,16
Porcentaje Grasa Visceral	0,35 \pm 0,16
Lípidos	0,74 \pm 0,16
Humedad	0,80 \pm 0,15
Proteína	0,67 \pm 0,36
Fuerza Máxima	0,64 \pm 0,08

3.4.1 Genotipado y Asignación de Paternidad

Contar con las herramientas actuales de la biología molecular, en especial de marcadores microsatélites, constituye un gran avance para la determinación correcta de las relaciones de parentesco, lo cual que a su vez es esencial para la estimación de los parámetros genéticos y valores mejorantes, en los programas de mejora genética. Esto se hace esencial en peces cuyo sistema de producción industrial es mediante puesta masal, como es el caso de espáridos como la dorada (Navarro *et al.*, 2008, 2009a). En este estudio se alcanzó un 100% de asignación con el uso de una nueva reacción múltiplex específica (SMsa1) que ha sido propuesta por Lee-Montero *et al.* (en prensa) como un panel de referencia de microsatélites para dorada, a pesar de la existencia de alelos nulos, coincidiendo con Navarro *et al.* (2009a) quienes utilizaron una PCR múltiplex interespecífica. La relevancia de utilizar esta nueva Súper-Múltiplex, radica en que sus marcadores, además de ser altamente polimórficos y específicos, han sido evaluados y valorados positivamente para la facilidad de lectura, lo que asegura que los resultados sean fiables y reproducibles entre laboratorios. Además los tamaños de los amplicones, fueron en su mayoría más cortos y homogéneos que los utilizadas en otras multiplex de dorada (Launey *et al.*, 2003; Navarro *et al.*, 2008; Porta *et al.*, 2010; Borrell *et al.*, 2011; Vogiatzi *et al.*, 2011), lo que maximizó la eficiencia de la amplificación conjunta. Ésto sumado al hecho de presentar un espacio adecuado entre los marcadores del mismo color que evitó que se solaparan (Bonin *et al.*, 2004) y a la posición de los marcadores en distintos grupos de ligamiento del mapa genético (Lee-Montero *et al.*, en prensa), han asegurado la eficacia de la SMsa1 en la asignación de parentesco, que junto al bajo costo de las reacciones múltiplex (Navarro *et al.*, 2008), la hace ideal para ser utilizada en programas de mejora.

La contribución es un hecho de gran relevancia en genética, pero particularmente importante en dorada, cuando se quiere imbricar la mejora genética en su sistema productivo a nivel de criadero. Si bien la alta tasa de fecundidad de dorada permite establecer lotes de producción para su engorde a partir de sólo una pareja de reproductores bajo puestas masales, lo que es un inconveniente importante desde el punto de vista de la mejora, ya que podría darse la circunstancia de que animales de alto valor genético no contribuyan bajo dichas circunstancias de producción, lo que impide maximizar la respuesta a la selección. En este sentido, es de gran relevancia práctica para las empresas, maximizar la contribución de los reproductores del núcleo bajo puestas masales industriales.

En el presente estudio, teniendo en cuenta todas las muestras analizadas, la mayor contribución se obtuvo en el lote del ICCM (85%), que es de hecho el lote más similar utilizado por las empresas (Brown *et al.*, 2005a; Navarro *et al.*, 2009a, 2009b). El mayor número de familias se obtuvo en el lote de

CSUR (193), lo que era de esperar teniendo en cuenta que fue el lote más numeroso. El número total de familias de hermanos completos fue de 297, con un número medio familiar de 17,7, superando el número de familias obtenidas (89) en la matriz de parentesco para la estimación de parámetros genéticos de Navarro *et al.* (2009a, 2009b), los cuales analizaron descendientes de un solo lote de reproductores y procedían todos de un solo día de puesta. Teniendo en cuenta solo los peces criados en Canarias, el número de familias de hermanos completos fue también muy alto (192) y sólo se encontraron 24 familias de medios hermanos menos que las obtenidas a partir de todos los datos. Por todo esto, la contribución media de este estudio, fue muy alta, así como el número de familias de hermanos completos y medios hermanos, apoyando la solidez de todos los parámetros genéticos estimados. Estos resultados ponen de manifiesto que la estructura que habitualmente utilizan las empresas de cría de dorada es compatible con la obtención de una importante contribución familiar así como de una gran conexión entre los individuos debido a la gran cantidad de apareamientos cruzados que se da en los lotes, lo que a su vez da mayor robustez a la estima de parámetros genéticos. De ahí que quizás la maximización de la contribución de los lotes de reproductores bajo puesta masal se circunscriba a una optimización del manejo de los mismos a través de estrategias que en parte ya son llevadas a cabo, como son obtener siembras en los periodos de máxima contribución (entre el día 60 y día 90 de la puesta), sembrar puestas de varios días consecutivos e incrementar la tasa de renovación o evitar diferencias de edad media entre reproductores a efectos de evitar la jerarquización de los lotes, evitando así asimetrías en la contribución familiar y la falta de representación familiar homogénea entre los reproductores bajo evaluación genética.

3.4.2 Resultados Fenotípicos

3.4.2.1 Crecimiento y Deformidad

El crecimiento representa el resultado neto de una serie de procesos fisiológicos y etológicos que comienzan con la ingesta del alimento y terminan en la deposición de la sustancia animal (Brett, 1979). Depende de factores relacionados con la alimentación, como la cantidad, disponibilidad, composición y digestibilidad del alimento, y de factores abióticos que muestran las condiciones en las que se cultiva el pez (temperatura, oxígeno, iluminación y salinidad). En este sentido, los valores fenotípicos de crecimiento de este estudio en las distintas edades (179, 389 y 539 dpe) coinciden de media con los descritos por Navarro *et al.* (2009a) para dorada engordadas también en Canarias. Sin embargo, al contrario que estos autores, los menores valores se registraron en los peces engordados en mar abierto, posiblemente porque estos peces se mantuvieron en una jaula exclusiva y más pequeña, que fue afectada por *fouling* en la red de la jaula lo que pudo haber afectado la circulación del agua dentro de ella, y con ello haber disminuido la disponibilidad de oxígeno, lo cual afecta a la tasa de alimentación y finalmente al crecimiento. También pudo haber influido el sistema de alimentación, ya

que en el ICCM fue a libre demanda, mientras que en la empresa fue de una toma al día, lo que coincide con lo descrito por Ginés *et al.* (2004a) y Navarro *et al.* (2009a) quienes comprobaron que la dorada mejora el crecimiento a través de la libre disponibilidad del alimento mediante comederos de autodemanda durante el engorde, ya que hace coincidir los picos de actividad circadiano con la disponibilidad del alimento (Jorgensen y Jobling, 1992).

Los cambios de crecimiento están fuertemente correlacionados con las fluctuaciones de temperatura (Ginés *et al.*, 2004a), por lo que la temperatura es uno de los principales impulsores de la tasa de crecimiento en peces (Karahan *et al.*, 2012). En el presente estudio, a la edad de sacrificio, los valores medios de crecimiento en Canarias superaron los obtenidos en el resto de las comunidades autónomas, como era de esperar, por encontrarse en una zona subtropical donde la temperatura oscila entre los 18 a 23°C. Igualmente, los peces engordados en Andalucía crecieron más que los de Murcia o Cataluña.

La aparición de las anomalías morfológicas, en particular las anomalías esqueléticas que afectan al complejo opercular, neurocráneo o columna vertebral, tienen un significado económico negativo en la producción de muchos juveniles de peces marinos (Izquierdo *et al.*, 2010). Las consecuencias económicas de las deformidades vertebrales son significativas en términos que reducen el peso a la cosecha, y más importante aún, reducen mucho el valor de venta por kilogramo de pez sacrificado (Gjerde *et al.*, 2005). Esta situación es especialmente delicada en dorada dado que se comercializa como pez entero, a diferencia de los peces que se comercializan fileteados como el salmón del Atlántico. Aunque incluso en estos casos no se solventa del todo el problema, puesto que el fileteado de un pez deforme no presenta las facilidades técnicas para ser procesado causando problemas al equipamiento (Gjerde *et al.*, 2005).

En este sentido, las tasas de prevalencia de deformidades de este estudio, en la población de doradas engordada en Canarias a lo largo de su crecimiento variaron según las edades y el tipo de deformidad. Durante la cría larvaria de dorada, Verhaegen *et al.* (2007) indicaron que la deformidad del opérculo es la más común, pudiendo afectar al 80% de la producción de alevines. Esto coincide con los datos de este estudio, ya que a talla de alevín (179 dpe), la mayor prevalencia fue la de la deformidad de opérculo. Sin embargo, a medida que pasó el tiempo, estos datos fueron disminuyendo independientemente del sistema de engorde, coincidiendo con lo sugerido por De Wolf *et al.* (2004) de que existe una recuperación de esta deformidad. De hecho, la prevalencia encontrada en este estudio a la edad de 179 dpe fue menor que la obtenida por otros autores, a edades más tempranas de dorada, como Galeotti *et al.* (2000), que observaron una prevalencia del 31,9% a los 80 dpe o Verhaegen *et al.* (2007) quienes obtuvieron un 28,5% en larvas de 69 dpe. Además, como los peces de este estudio estaban marcados individualmente, por primera vez se ha podido llevar a cabo una cuantificación

individual sobre la tasa de recuperación de la malformación de opérculo entre los 179 y 689 dpe, observándose que el 63,5% de los peces que presentaban esta deformidad a los 179 dpe, se recuperaron a los 689 dpe. Esto confirma lo sugeridos por De Wolf *et al.* (2004) y posteriormente por Verhaegen *et al.* (2007), de que el opérculo dañado se recupera a través de la regeneración parcial de elementos deformados, contradiciendo lo propuesto por Georgakopoulou *et al.* (2010) quienes indican que la prevalencia de la deformidad de opérculo disminuye por mortalidad selectiva de los individuos deformes. Esto es un dato interesante para la industria, ya que las crias de alevines debido a esta deformidad, que hacen actualmente las empresas (Afonso y Roo, 2009), están descartando individuos potencialmente sanos, lo que ha aumentado innecesariamente el coste asociado de alevines sanos vendidos. Otro dato relevante de este seguimiento es la edad a la que esta deformidad es detectada. En este estudio se observaron peces con deformidad de opérculo a la edad de 269 dpe que no habían sido detectados a la edad de 179 dpe, posiblemente por ser difícil de observar en animales pequeños, ya que se valoró externamente de manera visual tal como es llevado a cabo en la industria de dorada, o porque la deformidad se desarrolló más tarde, pero, en cualquier caso, no ocurrió en edades posteriores. Por tanto, según este estudio, los peces normales a los 269 dpe para la deformidad de opérculo no lo desarrollaran nunca y por el contrario, un alto porcentaje de los que presenten a esta edad la deformidad, se recuperaran perfectamente a los 689 dpe (en este estudio un 55%).

En el caso de las deformidades de columna y cabeza, sus prevalencias aumentan a lo largo del desarrollo, contrariamente a lo observado en la de opérculo. Esto podría deberse a que las deformaciones no son fácilmente reconocibles en el examen macroscópico de peces pequeños y a que estas deformidades, una vez que aparecen van acentuándose a medida que pasa el tiempo y el animal crece, como se ha visto en este estudio en el seguimiento individualizado de los peces e igual que observaron Bardon *et al.* (2009), en lubina, durante varias edades. No obstante, la prevalencia de deformidad de cabeza siempre fue menor que las de columna, mostrando, en general, porcentajes muy bajos, a diferencia de lo observado en otros estudios de espáridos como el bocinegro, donde la prevalencia fue mayor (Roo *et al.*, 2010b).

Con respecto a las diferencias entre instalaciones durante el crecimiento, en este estudio, se observa en la deformidad de columna una prevalencia significativa y estadísticamente mayor en los peces criados en ICCM con respecto a los criados en CANEXMAR, desde el día 389, posiblemente debido a los diferentes sistemas de engorde (tanques y jaulas), tal y como se ha visto cuando se han comparado diferentes sistemas de cultivo, aunque sea a edades más tempranas del desarrollo, obteniendo mayor prevalencia en ejemplares cultivados mediante técnicas intensivas (Divanach y Kentouri 1983; Chatain, 1994; Andrades *et al.*, 1996; Divanach *et al.*, 1996, 1997; Boglione *et al.*, 2001; Koumoundouros *et al.*, 2001; Sfakianakis *et al.*, 2004; Giménez y Estévez, 2005; Roo *et al.*, 2005; Georgakopoulou *et al.*, 2010; Izquierdo *et al.*, 2010). Sin embargo, el sistema de engorde no parece

influir en los otros dos tipos de deformidad, ya que no se observan diferencias significativas entre ambas estaciones en prácticamente todos los puntos de muestreo.

Por otro lado, a la edad de sacrificio, las tasas de prevalencia de deformidades de este estudio variaron también según el tipo de deformidad y las estaciones. La mayor media de prevalencia, se observó en las deformidades de columna. Coincidiendo con los datos de Oliva (2008), que valoraron un lote industrial de doradas de 430 g y observaron un 9,80% de peces deformes de columna frente a un 0,8 % deformes de cabeza y opérculo. Con respecto a las diferencias entre instalaciones, en este estudio, a edad de sacrificio se observó que las prevalencias de deformidad de opérculo casi no mostraron diferencias entre instalaciones, las de la cabeza fueron un poco más diferentes y las de la columna las más diferentes, confirmando que estas últimas parecen las más influenciadas por las condiciones ambientales (Karahán *et al.*, 2012). La prevalencia de deformidades totales (% de individuos con cualquier tipo de deformidad) a la edad de sacrificio llegó a 23,6% lo que coincide con Georgakopoulou *et al.* (2010) quienes indicaron, también en dorada, que las deformaciones afectan entre el 7 y el 20% como promedio a los juveniles producidos, aunque ocasionalmente esta prevalencia puede presentar valores más elevados de entre el 58 y el 83%, como por ejemplo, los descritos para lubina en Dupont-Nivet *et al.* (2008).

3.4.2.2 Caracteres de la Canal, Morfológicos con Análisis de Imágenes y de Composición de la Carne

Las variables de rendimiento son variables muy importantes desde el punto de vista económico y altamente apreciadas en la industria acuícola, tanto en las compañías que desarrollan el procesamiento de sus productos (Neira *et al.*, 2004) como a nivel de los consumidores, porque ellas representan la proporción de la parte comestible de los peces a la que se tendrá acceso con su compra. En este sentido, los valores de rendimiento de canal obtenidos en este estudio fueron altos y están en concordancia con los obtenidos por otros autores en doradas engordadas en la misma zona geográfica. Navarro *et al.* (2009a) obtuvieron valores medios del 91,7%, Ginés (1997) del 92,4% y Oliva (2008) del 90,9%. El músculo esquelético es el sistema orgánico más grande del pescado, coincidiendo con la parte comestible del mismo (Grigorakis, 2007). Expresado como rendimiento filete, en doradas de talla comercial representa del 34,3% al 48% del peso corporal total (Grigorakis, 2007), al igual que en otras especies como lubina (Saillant *et al.*, 2009), tilapia del Nilo (Nguyen *et al.*, 2010a), carpa común (Cibert *et al.*, 1999) y panga (*Pangasianodon hypophthalmus*) (Sang *et al.*, 2009). En este sentido, estos datos coinciden con los obtenidos en este estudio, así como con otros autores Navarro *et al.* (2009a) también en dorada.

En cuanto a la grasa visceral, ésta afecta negativamente a la impresión del consumidor sobre el pez, jugando un papel notable en su apreciación (Grigorakis, 2007), además de su efecto de disminuir el rendimiento de la canal (Navarro *et al.*, 2009a). Los valores del porcentaje de grasa visceral descritos para dorada de acuicultura están entre el 0,8 y el 2,5% (Santinha *et al.*, 1999; Grigorakis *et al.*, 2002; Grigorakis, 2007), lo que coincide con los datos del presente estudio. Además, Navarro *et al.* (2009a) describen una diferencia de porcentaje en doradas engordadas en dos instalaciones diferentes, obteniendo el mayor porcentaje en doradas de mayor peso, lo que concuerda también con lo observado en este estudio.

La calidad de la carne está dada por diferentes características como son su frescura, aspecto, olor, sabor, textura, firmeza, jugosidad, e incluso su procesamiento e higiene (Nguyen *et al.*, 2010b). Para determinar estas características se estudian variables de composición de la carne como el contenido de colágeno, proteína, lípidos y humedad en el músculo (Gjedrem, 1997). El contenido proteico, además de encontrarse involucrado en la calidad de la carne, es uno de los objetivos finales de la producción, ya que se desea optimizar el proceso de conversión del alimento en proteína muscular, en lugar de en un exceso de lípidos y desechos del procesamiento (Kause *et al.*, 2011). De las proteínas, el 3-10% es colágeno, que forma el principal tejido conectivo entre las células y que por lo tanto está relacionado con la textura de la carne (Sato *et al.*, 1986). El sabor y la jugosidad están alta y positivamente correlacionados con el contenido de grasa en el músculo y mantiene una relación inversa con la humedad (Grigorakis, 2007). Tradicionalmente, la composición de la carne, se ha analizado mediante métodos bioquímicos. Sin embargo, estos métodos son, en general, largos, costosos, invasivos e involucran el uso de agentes químicos peligrosos para la salud y el medio ambiente. Recientemente se ha introducido y normalizado el método NIR con los métodos químicos en dorada (Proyecto: *Caracterización de la Calidad del Pescado de Crianza*, financiado por la JACUMAR, convocatoria 2008), ya que es un método no invasivo, económico, simple, rápido y seguro para la salud y el medio ambiente (Weeranantanaphan *et al.*, 2011). Por todo esto está cada vez más integrado en la industria de la seguridad y calidad alimentaria (Berzaghi y Riovanto, 2009). En algunas especies de peces, el método NIR ya ha sido satisfactoriamente evaluado para predecir la composición de la carne (Trocino *et al.*, 2012), pero aún no existen datos publicados en dorada. En este sentido, los valores de este estudio para el porcentaje lípidos y humedad concuerdan con los descritos para dorada de acuicultura (3 y 11 % de grasa y 68,2-75,2% de humedad en Grigorakis, 2007), y con los obtenidos concretamente en doradas engordadas también en canarias por Ginés *et al.* (2004b) bajo régimen de fotoperiodo artificial (5,4% de lípidos y 71% de humedad) y por Navarro *et al.* (2009b) en condiciones industriales (9% de lípidos y 70% de humedad). Con respecto a los valores de porcentaje de proteínas, los valores de este estudio se encuentran en torno a los descritos para dorada de acuicultura a talla comercial (18-23% en Grigorakis, 2007), pero ligeramente superiores a los obtenidos en doradas engordadas también en Canarias de 17,7

% por Robaina *et al.* (1997) y de 21,6% por Ginés *et al.* (2004b). Al igual que en contenido de proteínas, los datos de este estudio del porcentaje de colágeno fueron mayores que los descritos para dorada (Suárez *et al.*, 2005; Navarro *et al.*, 2009b; Matos *et al.*, 2010). Corroborando esto, diez muestras de este estudio, se analizaron también para lípidos, humedad y proteínas, mediante métodos químicos (AOAC, 1990) y dieron valores ligeramente diferentes, aunque significativa y altamente correlacionados para los lípidos y humedad, y no significativos para la proteína (datos no mostrados). Esto está en consonancia con las correlaciones altas y significativas encontradas entre ambos métodos en otras especies de peces para la grasa y humedad (Folkestad *et al.*, 2008; McPherson *et al.*, 2011; Trocino *et al.*, 2012) y una correlación más baja para el contenido de proteínas en lubina (Trocino *et al.*, 2012).

El *Fish Fatmeter* (FF), es otro método indirecto, que usa la relación existente entre el contenido de agua y el contenido de grasa para medir de forma no invasiva, rápida, cómoda, fácil y económicamente asequible, el porcentaje de lípidos en el músculo del pez (Nielsen *et al.*, 2005). Sin embargo, no existen datos publicados mediante este aparato en dorada. Los valores obtenidos en este estudio para el porcentaje de grasa muscular mediante el FF fueron mayores que con el método NIR, pero se obtuvo una correlación positiva y significativa entre ambos métodos. Estos resultados concuerdan con los obtenidos en otras especies que han medido ambos métodos obteniendo valores diferentes pero positiva y significativamente correlacionados (Nielsen *et al.*, 2005; Saillant *et al.*, 2009; McPherson *et al.*, 2011).

La textura es otra importante característica de la calidad de la carne, la cual es apreciada por los consumidores y las compañías de alimentos (Neira *et al.*, 2004) y está directamente determinada por características estructurales del músculo (Johnston *et al.*, 2000). Una variable de textura, es la dureza, definida como la fuerza requerida para romper la muestra entre los dientes molares (Ginés *et al.*, 2004b). En este estudio se midió la dureza, del pez entero con un texturómetro a través del parámetro "fuerza máxima", que es la fuerza máxima que el aparato debe ejercer para penetrar el émbolo una distancia fija. Este parámetro es más relevante medirlo directamente en el filete. Sin embargo, en un muestreo de tantos individuos como el del presente estudio hubiera significado haberlo medido días después del sacrificio, y este parámetro se ve afectado a medida que pasan los días (Ginés *et al.*, 2002) y no hubiera sido representativo. Además, en un programa de mejora genética eficaz, se necesita valorar muchos animales de una manera rápida (Saillant *et al.*, 2009; Blonk *et al.*, 2010). Por todo esto, buscar métodos de medida de la textura alrededor de cómo se cotiza el precio del pez en el mercado (como pez entero), es una estrategia adecuada y necesaria. Los datos de este parámetro obtenidos en este estudio fueron mayores que los descritos para dorada en pez entero (1,68 Kg) (Ginés *et al.*, 2002), lo cual era de esperar teniendo en cuenta que estos autores lo midieron con un émbolo de menor diámetro y penetraron menos distancia.

La evaluación de la calidad de los productos a través de imágenes incluye su captura, procesamiento y análisis, facilitando el logro de los objetivos de calidad propuestos, con la ventaja de ser una técnica de evaluación no destructiva de los alimentos (Timmermans, 1998). La inspección visual automatizada en la industria alimentaria presenta importantes ventajas desde el punto de vista de su relación coste-eficacia, consistencia, mayor velocidad y precisión (Brosnan y Sun, 2004). Su aplicación en productos del mar es muy importante ya que los rasgos de apariencia para la comercialización de muchas especies de peces pueden influir directamente en la disposición del consumidor a pagar el precio del pescado (Blonk *et al.*, 2010). Grigorakis (2007) indica que el aspecto externo de una dorada refleja en cierta medida su historia de vida. En ejemplares silvestres la biometría del cuerpo muestra diferencias significativas con individuos cultivados en sistemas intensivos, estos últimos presentan cuerpos más compactos, es decir, más cortos, más anchos y más altos (Grigorakis, 2007). El presente estudio es el primero en dorada donde se miden caracteres morfológicos mediante análisis de imagen. Para usar este tipo de sistemas, en estudios de gran escala, es primordial que se analicen las imágenes de manera totalmente automática y que tengan una alta correlación con las medidas estándar de las variables. En este sentido, la aplicación de análisis de imagen "IMAFISH_ML" desarrollada por Navarro *et al.* (en preparación), utilizada en este estudio, ha permitido a partir de sólo dos fotografías del pez, analizar los archivos de manera totalmente automática y proporcionar más de 20 variables morfométricas. Además la correlación encontrada entre la longitud furcal obtenida con la fotografía y la longitud furcal medida directamente en el pez, fue alta, positiva y significativa, poniendo de relieve la eficacia del sistema de análisis.

3.4.3 Heredabilidades y Correlaciones

3.4.3.1 Crecimiento y Deformidad

En dorada, los caracteres de crecimiento son los más importantes desde el punto de vista económico, al igual que sucede en otras especies de peces de aptitud cárnica (Navarro *et al.*, 2009a). El peso y la longitud dependen de factores relacionados con la alimentación y con las condiciones de cría, no obstante, en general suelen presentar también una alta determinación genética en todos los animales (Cardellino y Rovira, 1987). En este sentido, en otras especies de peces se han estimado heredabilidades medias y altas para estos caracteres. Por ejemplo, en el salmón del Atlántico, Rye y Refstie, (1995) obtuvieron un valor de 0,35 para el peso; en tilapia del Nilo de 0,16 después de cinco generaciones en múltiples ambientes (Bentsen *et al.*, 2012); en carpa común, Nielsen *et al.* (2010) obtuvieron heredabilidades de 0,50 para peso y 0,49 para la longitud, aunque estaban sobreestimadas por las fuentes de parecido debidas al ambiente común; en bacalao del Atlántico (*Gadus morhua*) se obtuvieron valores de 0,28 para peso (Bangera *et al.*, 2011); en la panga, especie de agua dulce de gran producción en Vietnam, Sang *et al.* (2012) obtuvieron heredabilidades desde 0,21 a 0,34 también para el

peso. En lubina se obtuvieron heredabilidades de 0,54 para peso y 0,65 para longitud estándar (Volckaert *et al.*, 2012), aunque con altos errores típicos, lo que se puede deber a que los peces procedían de una familia desbalanceada de sólo 10 machos y 2 hembras. En dorada, Navarro *et al.* (2009a) estimaron heredabilidades para caracteres de crecimiento, a los 130, 165, 330 y 509 dpe, obteniendo valores medios de 0,31 para el peso, de 0,32 para la longitud y de 0,08 para la compacidad a partir de descendientes provenientes de un solo lote de reproductores. Las estimas de este estudio fueron en general mayores que las estimadas por estos autores, llegando a valores de 0,43, 0,40 y 0,20 al sacrificio para el peso, longitud y compacidad, respectivamente. Estos resultados eran de esperar, ya que se estimaron a partir de descendientes de tres lotes de reproductores no sometidos a presión de selección previa. Las correlaciones genéticas del presente estudio entre el peso y la longitud en cada edad, fueron altas y positivas (0,94 a 0,99), coincidiendo con las estimadas por Navarro *et al.* (2009a) y confirmando la propuesta de estos autores de que el peso o la longitud son criterios igualmente válidos para incluirlos en la selección y que a través de la longitud podría ser más adecuado por su mayor repetibilidad y mayor facilidad de trabajo en condiciones de campo. Por otro lado, las correlaciones genéticas del peso y longitud con el factor de condición fueron en general medias-altas y positivas, pero siempre mayores las del peso que las de la longitud, coincidiendo con las descritas por Navarro *et al.* (2009a).

Las deformidades, que condicionan la calidad del pez, es otro aspecto de suma importancia económica en la producción de dorada (Georgakopoulou *et al.*, 2010) y parecen ser consecuencia de muchos factores que influyen e interactúan (Boglione y Costa, 2011). Galloway *et al.* (1999) indicaron como una probable causa la temperatura en el proceso de cultivo, al observar cambios en el crecimiento del halibut (*Hippoglossus hippoglossus*); Kihara *et al.* (2002) obtuvieron una relación creciente de la corriente de agua con la lordosis en las larvas de doradas japonesas; Fernández *et al.* (2008) determinaron en dorada el efecto de los componentes de la dieta en la alimentación, como la vitamina A, en la mineralización de los huesos. El tipo de sistema de cultivo ha sido también ampliamente descrito como factor modulador de la aparición de deformidades esqueléticas, fundamentalmente relacionado con los sistemas intensivos de las técnicas de cría (Divanach y Kentouri, 1983; Chatain, 1994; Andrades *et al.*, 1996; Divanach *et al.*, 1996, 1997; Boglione *et al.*, 2001; Koumoundouros *et al.*, 2001; Sfakianakis *et al.*, 2004; Giménez y Estévez, 2005; Roo *et al.*, 2005; Georgakopoulou *et al.*, 2010; Izquierdo *et al.*, 2010). Sin embargo, cada vez son más los estudios que sugieren que las deformidades en peces, o al menos, algunos tipos de ellas, están determinadas por un importante componente genético aditivo. Concretamente, en dorada, Afonso *et al.* (2000) describieron una asociación familiar estadísticamente significativa para una triple deformidad de columna en sentido antero-posterior. Astorga *et al.* (2004) estudiaron 38 tipos de deformidades morfológicas sobre un lote de 11038 descendientes no cribados provenientes de un lote de reproductores con control individual del

apareamiento, estimando una heredabilidad del 85% para el carácter presencia-ausencia de cualquier tipo de deformidad. Thorland *et al.* (2006) estimaron una heredabilidad del 5% para la presencia-ausencia de deformidades de cabeza y 12% para la de deformidades espinales. Y en un estudio de segregación Rodríguez *et al.* (2011), revelaron a través de análisis fenotípico, un alto y significativo porcentaje de deformidad en descendientes cuando uno de sus padres era deforme, sugiriendo la posibilidad de determinación genética en la incidencia de deformidades para lordosis y fusión de vértebras. Las heredabilidades de este estudio para la presencia/ausencia de los tres tipos de deformidades fueron bajas y medias (0,07 y 0,26) en las distintas edades, confirmando que en la presencia/ausencia de todo tipo de deformidades, parte de su variación fenotípica tiene una base genética, coincidiendo con Astorga *et al.* (2004).

Con respecto a los tipos de deformidades, las heredabilidades estuvieron entre 0,00 y 0,60. La deformidad de columna fue la que presentó mayores heredabilidades, obteniéndose valores entre 0,16 y 0,60. Si bien, el valor de 0,60 se obtuvo a la edad de 179 días y podría ser una estima no muy precisa, teniendo en cuenta que es un carácter umbral y su prevalencia fue muy baja (Falconer y Mackay, 1996), de hecho fue la estima que presentó el error típico mayor. Todo esto confirma que las deformidades de columna (lordosis, cifosis, escoliosis y fusión de vértebras) en dorada presentan una importante variación genética aditiva, coincidiendo con los estudios de Afonso *et al.* (2000), Thorland *et al.* (2006) y Rodríguez *et al.* (2011), tal y como también se ha descrito para otras especies. Así, en salmón del Atlántico se obtuvieron heredabilidades de hasta 0,36 (McKay y Gjerde 1986; Gjerde *et al.*, 2005), en bacalao del Atlántico Kolstad *et al.* (2006) estimaron heredabilidades de 0,27 y en lubina se obtuvieron valores de 0,25 (Bardon *et al.*, 2009) y 0,21 (Karahán *et al.*, 2012), ambos mediante la transformación de Dempster y Lerner (1950). No obstante Castro *et al.* (2008) estimaron heredabilidades no significativas para deformaciones de lordosis ($0,02 \pm 0,019$) en dorada. Esto puede ser explicado porque estos autores realizaron cribas de deformes, tal y como lo hace la industria, sesgando los resultados, a diferencia de los obtenidos en este estudio, donde los peces no se cribaron en ningún momento, aportando robustez a los resultados de prevalencia y estimas genéticas de los caracteres de deformidad.

En cuanto a las heredabilidades de la deformidad del opérculo, se obtuvieron heredabilidades bajas, siendo el menor valor el estimado a la edad de 179 dpe, al contrario de lo descrito por Kauser *et al.* (2007) quienes indican que la baja prevalencia está relacionada con estimas de heredabilidades bajas, puesto que fue a esta edad donde la prevalencia de la deformidad de opérculo fue mayor. Estos datos ponen de relieve que a talla pequeña no se aprecia determinación genética para esta deformidad, coincidiendo con los resultados de segregación de Rodríguez *et al.* (2011) quienes observaron esta deformidad entre los 6 y 28 g y los resultados de Castro *et al.* (2008) que obtuvieron una heredabilidad no distinta de cero en alevines de dorada también para esta deformidad, si bien estos autores la midieron a la talla de ración y utilizando los procedimientos habituales de la industria. De hecho, a nivel fenotípico, existen estudios en alevines que asocian la prevalencia de esta deformidad con las

condiciones de cultivo (Gapasin y Duray, 2001; Roo *et al.*, 2005). Sin embargo, sí se aprecia determinación genética a otras edades obteniéndose heredabilidades de 0,11 a los 539 dpe. Tal y como se ha demostrado en el presente estudio, la prevalencia de opérculo sobre los mismos peces es mayor a talla pequeña que a talla de sacrificio, debido a la recuperación del opérculo, lo que explica que la estima de la determinación genética para esta deformidad es más precisa a tallas mayores.

Con respecto a las heredabilidades de las deformidades de cabeza, en este estudio no se encontraron valores distintos de cero, tal y como se ha visto en otras especies como carpa común (Kocour *et al.*, 2006). Esto puede ser debido por la falta de variación genética aditiva o por la dificultad de reconocer esta deformidad de una manera objetiva.

En definitiva, los resultados de heredabilidades para la presencia/ausencia por tipos de deformidades en este estudio, carácter de gran importancia para la industria de dorada, confirman que la deformidad de columna y de opérculo presentan una componente de variación genética aditiva que puede ser explotada en un programa de mejora genética, coincidiendo con los resultados de Astorga *et al.* (2004) y Thorland *et al.* (2006).

Acerca de las correlaciones de la presencia/ausencia de deformidad entre edades, en este estudio las correlaciones genéticas fueron altas y positivas (0,83 a 0,99), coincidiendo con los resultados de Bardon *et al.* (2009) en lubina quienes obtuvieron entre cuatro edades (35, 100, 400 y 800g) correlaciones genéticas altas y positivas (0,92 a 0,99) para deformidades de columna. Estos datos sugieren que se podría realizar la selección para esta deformidad a edades intermedias, que junto con la alta heredabilidad para la deformidad de columna, podría ser la edad de 389 dpe la indicada para este tipo de deformidad. Respecto a las correlaciones fenotípicas, éstas fueron medias-altas y positivas (0,38 a 0,86) en este estudio. Esto era de esperar ya que si un pez es deforme a edades tempranas lo sigue siendo durante toda su vida, excepto para la deformidad del opérculo donde a edades tempranas es donde se produce mayor tasa de recuperación, por eso entre edades pequeñas y edades distantes se obtuvieron los menores valores. Además, a edades pequeñas está la desventaja de la dificultad de observar y detectar correctamente las deformidades (Gjerde *et al.*, 2005), sin embargo a edades mayores se obtuvieron las mayores correlaciones demostrando que el personal clasificador utilizado en este estudio estaba bien entrenado no siendo un elemento distorsionador a la hora de las estimas. No obstante, no se puede negar la existencia de peces con deformidades de columnas que aparentemente son normales, pero internamente son deformes, llamados peces falsos negativos (Gjerde *et al.*, 2005). Este hecho sumado con la importancia de tener una alta precisión de las estimas para este carácter, en especial si se desea realizar a edades intermedias, para lograr una eficiente selección individual, no debería depender exclusivamente de la calidad de los clasificadores y tampoco de la observación directa de la espina durante el fileteo, y sería recomendable el uso de metodologías no invasivas como los rayos X, tal y como también recomiendan Bardon *et al.* (2009) en lubina.

En cuanto a las correlaciones genéticas obtenidas en este estudio entre los caracteres de crecimiento con la deformidad, éstas fueron, en general, medias y positivas. Esto contrasta con correlaciones bajas y negativas estimadas para deformidades vertebrales en otras especies como el salmón del Atlántico (Gjerde *et al.*, 2005) y la trucha arcoíris (Kause *et al.*, 2005). Kause *et al.* (2005) explicaron que es probable que una vez que un pez se deforma, su ganancia de peso se reduce porque la deformidad produce un acortamiento del cuerpo y con ello disminuye su capacidad de natación y acceso al alimento (McKay y Gjerde, 1986). Sin embargo, las correlaciones positivas de este estudio estuvieron en consonancia con las obtenidas en lubina entre deformidades de columna con peso y longitud a distintas edades por Bardon *et al.* (2009) (0,0,40) y por Karahan *et al.* (2012) (0,07-0,13). Así como con las obtenida en bacalao del Atlántico por Kolstad *et al.* (2006) entre peso y deformidades de columna (0,50). Todo esto pone de relieve que un crecimiento rápido debe ser reconocido como un factor de riesgo para la incidencia de deformidades en peces y en concreto en dorada. Por lo que sería de suma importancia incluir este carácter en los índices de selección, si seleccionamos para el crecimiento mediante la longitud como propusieron Navarro *et al.* (2009a), si no se quiere obtener un aumento en la prevalencia de deformidades tan perjudiciales para la industria. Tal y como se ha visto en animales terrestres donde la selección para el crecimiento ha venido acompañado en muchos casos con desórdenes del desarrollo (Whitehead *et al.*, 2003; Gjerdrem *et al.*, 2005; Kause *et al.*, 2005). Más aun, teniendo en cuenta que, en general, la respuesta a la selección para la tasa de crecimiento de las especies acuáticas es muy buena en comparación con la de los animales de granja terrestres (Dunham, 2011) y que el objetivo de selección de mayor importancia económica en la mayoría de los programas de selección genética en peces es el crecimiento (Gorshkov, 2006).

Con respecto a las heredabilidades de este estudio para las variables de crecimiento y presencia/ausencia de deformidades, estimadas a partir de los peces criados en las cuatro comunidades autónomas, a la edad de sacrificio, los valores fueron algo más bajos. Posiblemente, debido al aumento en la variabilidad de la manera de medir, que aumentan la variabilidad ambiental y disminuyen las estimas. Si bien, los errores típicos bajaron debido al aumento en el número de individuos incluidos en la matriz (Falconer y Mackay, 1996). Todo esto, coincide con las heredabilidades estimadas para los mismos caracteres en lubina a partir de los peces criados en distintos lugares, cuyos valores fueron mayores que los estimados a partir de todos los datos juntos (Dupont-Nivet *et al.*, 2008; Karahan *et al.*, 2012).

3.4.3.2 Caracteres de la Canal, Morfológicos con Análisis de Imágenes y de Composición de la Carne

Las variables de rendimiento son variables muy importantes desde el punto de vista económico y cada vez más apreciadas en la industria acuícola. En algunos países, la comercialización de filetes en

lugar de pescado entero ha llegado a ser común en mercados internos y externos (Ponzoni *et al.*, 2011), de aquí la importancia de estudiar los parámetros de rendimiento en los programas de mejora genética.

En este estudio, el peso de canal y el peso de filete presentaron heredabilidades medias de 0,45 y 0,41 respectivamente, superiores a las estimadas también en dorada por Navarro *et al.* (2009a). Sin embargo, a diferencia de estos autores, quienes obtuvieron heredabilidades medias de 0,31 para el rendimiento canal y de 0,12 para el rendimiento filete, éstas en este estudio prácticamente no presentaron heredabilidad.

Con respecto a las correlaciones de estos caracteres con los de crecimiento, las correlaciones genéticas obtenidas en este estudio para el peso canal y peso filete fueron altas y positivas (0,74-0,99). Estos altos valores son consistentes entre especies (Neira *et al.*, 2004; Doupé y Lymbery, 2005; Rutten *et al.*, 2005; Kause *et al.*, 2007; Kocour *et al.*, 2007; Powell *et al.*, 2008) y coinciden también con las observadas por Navarro *et al.* (2009a) en dorada. Todo esto corrobora lo indicado por estos autores de que 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. De hecho, Nguyen *et al.* (2010a) obtuvieron en tilapia del Nilo una respuesta correlacionada del 23%, con respecto a la población control, para el peso filete en la sexta generación, seleccionando a través del peso, longitud y otras medidas corporales, con correlaciones similares a las de este estudio (0,78 a 0,96). En cuanto a las correlaciones del rendimiento filete, estas fueron también altas y positivas (0,66-0,79), que contrastan con las negativas encontradas por Navarro *et al.* (2009a) en dorada, pero coinciden con las descritas en otras especies como *black bream* (*Acanthopagrus butcheri*) (Doupé y Lymbery, 2005), tilapia del Nilo (Rutten *et al.*, 2005) o carpa común (Kocour *et al.*, 2007). Esto pone de relieve que el rendimiento filete también se podría mejorar de manera indirecta seleccionando a través del crecimiento, es decir a través de la longitud. Más aún, la magnitud de las correlación del rendimiento filete frente a la longitud, y sus heredabilidades, predicen una mayor respuesta correlacionada para dicho carácter que la respuesta directa. Esto es relevante porque aunque actualmente la dorada se vende fundamentalmente como pez entero, estudios de mercado sugieren que su comercialización fileteada sería una opción rentable y de mucha demanda (Luna *et al.*, 2006), más aún teniendo en cuenta que en la sociedad actual el consumo de pescado fileteado va en aumento. Por contraste, el rendimiento canal presentó, en general, correlaciones genéticas bajas y negativas con los caracteres de crecimiento, con altos errores típicos. Estas correlaciones coinciden con los valores cercanos a cero obtenidos en dorada (Navarro *et al.*, 2009a) y trucha arcoíris (Kause *et al.*, 2002, 2007).

El porcentaje de grasa visceral, mostró una importante componente genética aditiva (0,29), inferior a la descrita en dorada (0,50) por Navarro *et al.* (2009b) pero en concordancia con la descrita para otras especies (0,10-0,35) (Gjerde y Schaeffer, 1989; Rye y Gjerde, 1996; Kause *et al.*, 2002; Neira *et al.*, 2004). Esta heredabilidad, junto con la correlación media y positiva obtenida con el rendimiento

canal, apoya la sugerencia de Navarro *et al.* (2009b) de 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. Además, si no se incluyera, teniendo en cuenta las negativas correlaciones genéticas del rendimiento canal, con la longitud y con el rendimiento filete, y las positivas correlaciones del porcentaje de grasa visceral con estos mismos caracteres, a la larga se podría producir un detrimento en el porcentaje canal, a costa de un incremento de la grasa visceral, al seleccionar a través del crecimiento.

El análisis de imagen para la obtención de mediciones, ha sido ampliamente utilizado en agricultura (Costa *et al.*, 2010) y en producción animal (Mursawa *et al.*, 2008; Osawa *et al.*, 2008; Ruis-Vilarrasa *et al.*, 2010). En un estudio a gran escala, como es un programa de mejora, es importante que la segmentación de la imagen sea automática (Stien *et al.*, 2006). Además, en general, esta metodología reduce la variación entre las mediciones y aumenta la precisión de las estimas de parámetros genéticos (Blonk *et al.*, 2010). En peces, existen estudios que han utilizado el análisis de imágenes para la estima de parámetros genéticos, aunque son escasos. Kause *et al.* (2008) estudiaron la deposición de lípidos y proteínas en trucha arcoíris alimentadas con distintas dietas, en un corte transversal del pez, a través de una imagen realizada en un escáner, estimando heredabilidades para el color y porcentaje de lípidos en distintas zonas del corte (0,36-0,70); en solea común, Blonk *et al.* (2010) obtuvieron heredabilidades desde 0,25 a 0,34, para distintas medidas del pez, mediante análisis manual de una foto lateral del pez; en lubina, Costa *et al.* (2010), estimaron heredabilidades de 0,43 a 0,55, para la morfología del pez, determinada por análisis de puntos de referencia anclados en el contorno del pez en fotos laterales. Todos estos resultados revelan el gran potencial para la mejora genética, que tiene el análisis de imagen, especialmente por correlación que tienen los caracteres *tipo* con los caracteres *productivos*.

En el presente estudio se eligieron 11 de las 27 variables determinadas por análisis de imagen de manera totalmente automatizada (Navarro *et al.*, en preparación), por la relación que *a priori* podían tener con los caracteres de interés comercial, para la estima de parámetros genéticos. Sus heredabilidades fueron medias y altas (0,17 y 0,51) y son las primeras estimas para estos caracteres en dorada.

Con respecto a las variables dimensionales (área, longitud, ancho, alto y volumen), la magnitud de sus heredabilidades fue, en general, similar a la obtenida para el peso y la longitud del pez. Estos valores, están en consonancia con otras estimas de medidas del pez, obtenidas de manera manual y directa sobre el mismo, en otras especies, como tilapia del Nilo, en la cual, Rutten *et al.* (2005) estudiaron características del filete y lo relacionaron con medidas del cuerpo, obteniendo heredabilidades para el ancho del pez y la longitud de la cabeza (0,25-0,27) similares al peso y la longitud (0,25-0,26) y Nguyen *et al.* (2010a) estimaron heredabilidades para el ancho y profundidad del pez (0,20-0,32) también similares al peso y longitud (0,31). En concreto, las variables obtenidas en este

estudio a partir de la foto lateral, tuvieron una heredabilidad mayor, que las dorsales, e incluso superiores a las del peso y la longitud. Probablemente, porque las fotos dorsales tienen un pequeño error debido a la profundidad de campo, que aumenta la varianza ambiental. Con respecto a sus correlaciones fueron todas muy altas y positivas, coincidiendo también con los otros autores (Rutten *et al.*, 2005; Nguyen *et al.*, 2010a), confirmando la hipótesis de que hay muy poca o ninguna independencia en la covariación de las componentes genética aditivas entre medidas corporales (Nguyen *et al.*, 2007).

En animales terrestres donde la mejora está bien establecida, se han encontrado caracteres morfológicos o caracteres tipo correlacionados genéticamente con caracteres productivos (Simm, 1998; Conafe, 2012), de modo que se pueden seleccionar estos últimos mediante criterios rápidos, fáciles de medir y no invasivos. En los peces, los caracteres de rendimiento son de suma importancia, como ya se ha mencionado, y para ser medidos es necesario sacrificar al animal, por lo que diversos estudios han tratado de desarrollar ecuaciones de predicción de éstos basadas en mediciones de rasgos corporales (Rutten *et al.*, 2005; Sang *et al.*, 2009; Nguyen *et al.*, 2010a). Independientemente de los métodos y el número de caracteres utilizados, la conclusión general de estos estudios fue que el peso filete se puede predecir con precisión a partir de los rasgos corporales, sin embargo, no consiguieron una predicción del rendimiento filete suficientemente precisa. Posiblemente debido a la variación que supone el fileteado manual (Sang *et al.*, 2009). En este sentido, las correlaciones genéticas de este estudio, de los caracteres dimensionales medidos mediante las fotografías, mostraron correlaciones genéticas frente a los caracteres de la carcasa, similares a las obtenidas por el peso y la longitud: cercanas a uno con el peso filete y peso canal, bajas con el rendimiento canal (0,00-0,20), altas con el rendimiento filete (0,73-0,88) y medias con el porcentaje de grasa visceral (0,40-0,44). Por lo que con estas variables, obtendríamos la misma respuesta para los caracteres de rendimiento que si seleccionamos a través del crecimiento. No obstante, matemáticamente se podría calcular una nueva variable que pudiera tener una correlación mayor con los caracteres de rendimiento. Esta es la ventaja del análisis de imagen, que disponemos de un gran número de variables con las que trabajar, por lo que es una herramienta con un gran potencial en la que habría que seguir profundizando y buscando nuevas medidas combinadas.

Por otro lado, la selección sobre caracteres de crecimiento puede alterar la forma de los peces a través de las respuestas indirectas a la selección (Blonk *et al.*, 2010), además de que un crecimiento acelerado puede ir acompañado de un aumento en la prevalencia de algún tipo de malformación en el animal, como se ha visto en animales de granja (Gjerdrem, 2005) y también en peces (Gjerde *et al.*, 2005), por lo que es importante estudiar variables de morfología de los peces y su relación con el crecimiento. En este estudio, se estimaron heredabilidades para variables de excentricidad y sus correlaciones con caracteres de crecimiento y de deformidad. Estos caracteres mostraron determinación genética (0,17-0,35), aunque menos que las variables dimensionales. En general, las

correlaciones de la excentricidad del pez fueron menores que las de la cabeza, pero en la magnitud de la heredabilidades fue al contrario. Con respecto a los caracteres de crecimiento, de rendimiento y dimensionales sus correlaciones genéticas fueron altas y negativas, poniendo de relieve que mientras más crezca el pez más “globoso” será, lo cual es esperable, teniendo en cuenta la correlaciones positivas del peso y la longitud frente a la compacidad. Con respecto a las correlaciones con las variables de deformidad, éstas fueron bajas y con altos errores, ni siquiera con la de deformidad de columna se observó una correlación alta, como se podría esperar. Sin embargo, no se descarta la posibilidad de encontrar por análisis matemático, como se explicó anteriormente, nuevas variables o conjunto de ellas que interpreten la morfología de la dorada y localicen deformidades, más aún teniendo en cuenta la alta determinación genética de todas estas variables.

Todos estos datos ponen de relieve que las variables dimensionales, a partir de la foto lateral (LF, ATL, AIM, AF, LSC, AICa), tienen heredabilidades más altas que el peso y la longitud y correlaciones cercanas a 1,0 con peso, longitud, peso canal y peso filete y altas con rendimiento filete, por lo que serían candidatas igualmente válidas a ser usadas como criterios de selección para estos caracteres, permitiendo incluso una respuesta indirecta mayor que por selección directa. En concreto, el carácter *AICa* (alto de cabeza) mostró la mayor heredabilidad lo que lo predispone como un criterio de selección eficaz y no invasivo para mejorar indirectamente estos caracteres. Además, de este modo, con una sola fotografía lateral del pez, que además es la más sencilla de las dos, se obtendrían estos datos de una manera rápida, objetiva y sin errores, ahorrando tiempo al evitar pesar, medir y pasar datos. No obstante, para analizar las deformidades, con los datos disponibles, se deberían implementar otras aplicaciones que detecten mejor las anomalías morfológicas. Teniendo en consideración todo esto, para obtener mejores resultados, se propone como una idea a desarrollar, la implementación de una cinta transportadora, con una cámara de fotos acoplada y un equipo para radiografías o espectroscopia infrarroja cercana (Brosnan y Sun, 2004). De modo que el pez avance por la cinta, entre en una caja negra donde se le saque una fotografía lateral (para la cual no es necesario que el pez esté colocado de ningún modo, ya que el programa gira el pez automáticamente) y a continuación se le saque una radiografía. De esta manera se podrían determinar rápidamente variables de crecimiento, rendimiento y deformidad, *in vivo*, con un sistema automático, no invasivo e inocuo para el producto.

Los consumidores y la industria están cada vez más interesados en la calidad de la carne, sobre todo en los productos de acuicultura, ya que están comparándose siempre con los de pesquería. Las heredabilidades para los caracteres de composición de la carne, obtenidas en este estudio fueron desde valores de cero a valores altos. Los porcentajes de lípidos y humedad muscular presentaron determinación genética aditiva media (0,17-0,20), significativamente superiores a los valores obtenidos también en dorada por Navarro *et al.* (2009b) (0,05-0,09). Probablemente debido a la técnica usada, ya que estos autores determinaron estos parámetros mediante métodos químicos y manuales, y en este

estudio se determinaron mediante el NIR. Éste, aunque es un método indirecto, está altamente correlacionado con el método químico pero minimiza el error ambiental, ya que se realiza en un solo paso y de manera totalmente automática. Respecto a las heredabilidades para el porcentaje de proteínas y el de colágeno, éstas fueron muy bajas, prácticamente no distintas de cero. Navarro *et al.* (2009b) también obtuvieron los valores más bajos para el porcentaje de colágeno. Estos valores son consistentes entre especies, independientemente del método de análisis, ya que, así como para el porcentaje de grasa y humedad muscular, se han obtenido heredabilidades medias y altas (Gjerde y Schaeffer, 1989; Iwamoto *et al.*, 1990; Neira *et al.*, 2004; Saillant *et al.*, 2006; Quinton *et al.*, 2007; Vieira *et al.*, 2007; Powell *et al.*, 2008; Kause *et al.*, 2011), no se ha encontrado determinación genética para el porcentaje de proteínas (Gjerde y Schaeffer, 1989; Quinton *et al.*, 2007; Kause *et al.*, 2011). Posiblemente, debido a los mecanismos de homeostasis del cuerpo para mantener los niveles de proteínas estables (Kause *et al.*, 2011).

Con respecto a sus correlaciones, la correlación genética entre lípidos y humedad fue alta y negativa, coincidiendo con las descritas tanto en dorada como en otras especies (Iwamoto *et al.*, 1990; Kause *et al.*, 2002; Quinton *et al.*, 2007; Navarro *et al.*, 2009b). La de proteínas con colágeno fue alta y positiva, como era de esperar, teniendo en cuenta que el colágeno es una proteína. Con respecto a las correlaciones de éstas con la humedad y los lípidos no son muy consistentes, posiblemente debido a sus bajas heredabilidades (Kause *et al.*, 2011).

Acerca de la relación de las variables de composición con el crecimiento, se estimaron correlaciones con la longitud, basados en Navarro *et al.* (2009a), quienes propusieron la longitud como criterio de selección para el crecimiento. La longitud mostró en este estudio una correlación alta y negativa con la humedad y baja y positiva con los lípidos musculares, confirmando lo sugerido por Navarro *et al.* (2009b), de que la selección para el crecimiento favorecería indirectamente, o al menos no perjudicaría la calidad de la carne, ya que en dorada, un aumento del contenido graso del músculo mejora los atributos de la carne (Grikorakis, 2007).

En relación al porcentaje de grasa muscular, medido mediante el *Fish Fatmeter* (FF), es de destacar, que los parámetros genéticos de este estudio estimados mediante este método, son los primeros en dorada. El FF es un método no invasivo para determinar el porcentaje de lípidos, el cual se midió en el lomo del pez. La heredabilidad obtenida en este estudio fue alta y mucho mayor que la estimada mediante el método NIR o el método químico (Navarro *et al.*, 2009b) y mostró una alta correlación genética, positiva con el porcentaje de lípidos (0,99) y negativa con la humedad (-0,75). Estas altas correlaciones están en concordancia con las obtenidas por Kause *et al.* (2011) en lavareto (*Coregonus lavaretus*) y Saillant *et al.* (2009) en lubina. Estos autores estimaron también correlaciones genéticas del porcentaje de lípidos a partir de medidas con el FF y NIR (Kause *et al.*, 2011), y el FF y un método químico (Saillant *et al.*, 2009). Estos datos ponen de relieve la fiabilidad del FF y el potencial que

tiene en la mejora genética. De hecho, Quillet *et al.* (2005) obtuvieron una respuesta a la selección significativa tras dos generaciones, para el contenido de lípido muscular medido con el FF, estimando una heredabilidad realizada del 25% para este carácter. Estos datos ponen de relieve, que si bien en dorada, seleccionando el crecimiento se mejoraría la grasa muscular, o al menos no se perjudicaría, el FF es un método no invasivo, rápido y eficaz, con el que se podría controlar este parámetro en un programa de mejora genética e incluirlo en el caso de que fuera necesario, teniendo en cuenta su alta heredabilidad.

Con respecto al porcentaje de grasa visceral, este estudio presentó correlaciones genéticas medias con los lípidos NIR y los lípidos FF, así como con la longitud, que contrastan con las fuertes correlaciones del FF con el NIR y con la longitud. Estos datos coinciden con los de Saillant *et al.* (2009), quienes sugieren que la grasa visceral y la grasa muscular podrían ser modificables independientemente en un programa de mejora genética.

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). De hecho los parámetros genéticos de este estudio para la fuerza máxima, el cual es un parámetro de textura, son las primeras estimas en dorada, obteniéndose una heredabilidad de 0,17. Este valor contrasta con los resultados de Neira *et al.* (2004) en salmón coho, quienes no encontraron determinación genética para este carácter, si bien lo midieron con un texturómetro manual sobre pez entero. Sin embargo, Kauser *et al.* (2011) estimaron una heredabilidad del 30% en lavareto, sobre un trozo de filete. Esto revela que la heredabilidad de la textura puede ser fácilmente influenciada por el método de medida, lo que podría generar variación entre los estudios. Con respecto a sus correlaciones, éstas fueron negativas con la longitud, con todos los lípidos, con las proteínas, y con el colágeno y positiva con la humedad. Esto sugiere que el pez es más blando cuanto más grande es, y más grasa, proteínas y colágeno tiene. Sin embargo, es sabido que el colágeno forma el principal tejido conectivo entre las células y que los filetes más blandos son los de menor contenido en colágeno (Hatae *et al.*, 1986). Por lo que puede ser que la medida de la textura en pez entero, tal y como se midió en este estudio, no sea la adecuada para estudiar la textura del filete y que se encuentre condicionada por el tamaño del pez, ya que al haber establecido una distancia fija, en los peces pequeños sea necesario ejercer más fuerza al tener menos carne que en los más grandes. Por tanto, se sugiere para futuros estudios adaptar la distancia de penetración a cada tamaño del pez o estimarla en el filete, si bien la matriz posible en este último caso siempre sería más escasa que con otras soluciones. No obstante, esto no desvaloriza el resultado de este estudio de que la textura presentó determinación genética aditiva.

Sería legítimo pensar que en un futuro no muy lejano el sistema de comercialización pudiera cambiar del sistema de pago basado en el peso del pescado entero al de peso de los filetes, de una manera similar a lo que ocurrió en la ganadería (McLeod, 2003). En este sentido, las estimas de parámetros genéticos de este estudio sugieren que la inclusión de caracteres como la longitud, el FF, la grasa visceral, y la deformidad de columna, como criterios en programas de mejora genética de dorada, podrían liderar una rápida respuesta a la selección mejorando el rendimiento y la calidad del pez y de la carne.

3.4.4 Interacción Genotipo-Ambiente

En especies de amplia distribución geográfica como la dorada, las empresas desean exportar su producción a diferentes destinos o condiciones de engorde. Al mismo tiempo, pueden utilizar diferentes sistemas de producción o distintas ubicaciones para el engorde, como tanques, jaulas o esteros. Por todo esto es importante estimar las interacciones GxA, ya que éstas pueden limitar o incluso perjudicar el progreso genético (Saillant *et al.*, 2006; Dupont-Nivet *et al.*, 2008), ya que el mejor genotipo para un ambiente no es necesariamente el mejor genotipo para otro, y los animales genéticamente mejorados que funcionan bien en unas condiciones pueden no ser necesariamente los mejores en otras (Dunham *et al.*, 2001). Por lo tanto, el desarrollo de programas de selección requiere del conocimiento de los parámetros genéticos y la existencia o no de interacciones GxA (Winkelman y Peterson, 1994). La interacción GxA depende de los caracteres involucrados, de la población y de los ambientes estudiados, siendo difíciles de predecir (Dupont Nivet *et al.*, 2008). Las altas correlaciones genéticas entre los peces engordados en el ICCM y Canexmar, obtenidas en este estudio, evidenciaron la no existencia de interacción GxA, para todos los caracteres analizados al sacrificio entre los peces engordados en Canarias bajo dos sistemas de engorde diferentes, tanques y jaulas. Estos resultados coincidieron con los estimados en dorada por Navarro *et al.* (2009a y 2009b), a la vez que consolida los mismos, quienes describieron una ausencia de interacción GxA en caracteres de crecimiento, rendimiento y calidad de la carne a través de correlaciones genéticas de éstos caracteres en dos ambientes (jaulas insulares y tanques). También, Ponzoni *et al.* (2005), en tilapia del Nilo, obtuvieron similar respuesta para el peso tanto en jaulas como en tanques y 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. Sin embargo, existen evidencias de que la interacción GxA incrementa en animales de acuicultura al aumentar las distancias genéticas y las diferencias ambientales, especialmente asociadas con especies como las carpas y las tilapias (Dunham *et al.*, 2001). No obstante las correlaciones genéticas para la longitud y las deformidades obtenidas en este estudio entre las cinco estaciones donde los peces fueron engordados, fueron aún más altas que las mencionadas anteriormente, revelando también la ausencia de interacción GxA para estos dos caracteres, de gran interés económico comercial, a escala nacional. Coincidiendo con

los resultados de Karahan *et al.* (2012), quienes no evidenciaron interacciones GxA para las deformidades, en lubinas engordadas en cuatro granjas diferentes.

Esto se puede deber a que la dorada es una especie con hábitos eurihalinos y euritéricos, ocupando ambientes marinos y salobres muy distintos entre sí, en particular durante las etapas iniciales de su ciclo de vida (FAO, 2006), lo que podría estar contribuyendo a que no existan diferencias en su potencial genético en los distintos ambientes. No obstante, hay que tener en cuenta, que en este estudio se analizó una sola generación y que las doradas fueron cultivadas hasta los 179 dpe en mismo ambiente común, hasta que fueron marcadas y enviadas a las distintas estaciones. Esto pudo limitar la posibilidad de observar interacción GxA en el período de engorde, al igual que ocurrió en lubina (Dupont Nivet *et al.*, 2008), por lo que sería necesario en el futuro, estimar las interacciones GxA en doradas que sean cultivadas desde huevos en distintos lugares, y estudiarlas durante varias generaciones, o bien marcar desde tallas anteriores a los 3 g (Navarro *et al.*, 2006), para homogenizar su cultivo desde pesos más bajos (Baffoun, 2012).

En dorada existen escasos parámetros genéticos publicados, quizá debido al bajo número de programas de mejora genética existentes (Rye *et al.*, 2010). Por esta razón, cobran especial importancia los resultados del presente estudio que muestran la posibilidad de implementar nuevos programas de mejora genética para dorada a escala nacional, ya sea en un único ambiente, como en múltiples ambientes, pudiendo las empresas exportar sus producciones mejoradas genéticamente entre comunidades sin disminuir su respuesta, tal y como se ha sugerido en otras especies (Kolstad *et al.*, 2006; Dupont Nivet *et al.*, 2008).

4. CONCLUSIONES

4. CONCLUSIONES

1. Se ha normalizado un procedimiento de evaluación de marcadores microsatélites (*GremmProtocol*) basado en la facilidad de lectura, la cual se valoró mediante amplificación inadecuada, pérdida de un alelo, patrón de bandas confuso y alelos intermedios, que afectan a la determinación y redondeo de los alelos.
2. Se ha desarrollado una batería de 79 marcadores microsatélites (llamada *Radal*) a partir del mapa genético de dorada, que son altamente informativos, se ajustan al *GremmProtocol*, que funcionan bajo las mismas condiciones de amplificación y que por lo tanto permiten diseñar nuevas PCRs múltiplex según las necesidades del usuario.
3. Se han estandarizado dos reacciones de PCRs múltiplex de 11 marcadores microsatélites cada una a partir de *Radal*, denominadas SMsa1 y SMsa2, las cuales son altamente eficientes en estudios de reconstrucción de las relaciones de parentesco y son propuestas como panel de referencia, o *international panel*, para dorada.
4. Los caracteres de crecimiento en dorada (peso, longitud y compacidad), en todas las poblaciones incluidas en el proyecto PROGENSA®, presentan heredabilidades medias-altas a las diferentes edades de interés comercial. Siendo la longitud un carácter más repetible y más sencillo de medir en instalación, sobre el que llevar a cabo selección directa.
5. En general, el carácter presencia/ausencia de cualquier tipo de deformidad en dorada presenta una considerable determinación genética aditiva en todas las poblaciones que han sido estudiadas en el contexto del proyecto PROGENSA®.
6. Las deformidades esqueléticas de columna (lordosis, cifosis, escoliosis y fusión de vértebras), en dorada, presentaron heredabilidades medias-altas, según la edad.
7. La deformidad esquelética de opérculo en dorada mostró heredabilidades bajas, presentando los valores más altos a la edad adulta. Mientras que las deformidades esqueléticas de cabeza no mostraron determinación genética aditiva.

Conclusiones

8. Por primera vez en dorada, se comprueba que la prevalencia de la deformidad esquelética de opérculo decrece con el desarrollo debido a la recuperación de la morfología normal del pez, todo lo que tiene efecto en la estimación de las heredabilidades, e indicando que las empresas pueden minimizar los costes de producción de alevines evitando desechar los peces con opérculo durante los procesos de criba.

9. Las correlaciones genéticas entre los caracteres de crecimiento fueron altas y positivas, mientras que las estimadas entre caracteres de crecimiento y deformidades esqueléticas fueron en general medias en todas las edades de interés comercial, lo que está en consonancia con las altas correlaciones genéticas positivas estimadas entre esas mismas edades para la deformidad.

10. Los caracteres de la canal (peso canal, peso filete y porcentaje de grasa visceral), del presente estudio mostraron componentes genéticas aditivas medias-altas, mientras que los porcentajes canal y filete fueron bajas.

11. En general, todos los caracteres morfológicos analizados mediante el programa de análisis de imágenes *IMAFISH_ML* mostraron determinación genética aditiva alta. Las correlaciones genéticas entre ellos fueron muy altas y positivas, a la vez que altas y positivas con todas las medidas dimensionales, y altas y negativas con las de excentricidad del pez y de la cabeza. Por otro lado, las correlaciones genéticas entre todos los caracteres morfológicos y los caracteres de crecimiento y de la canal fueron muy altas y positivas, excepto para el porcentaje canal, que mostró valores bajos.

12. De entre todos los caracteres morfológicos analizados mediante el programa de análisis de imágenes *IMAFISH_ML*, el carácter *AICa* (alto de cabeza) mostró la mayor heredabilidad, lo que permite ser utilizado como criterio de selección para mejorar indirectamente los caracteres de crecimiento y la mayoría de los de rendimiento de filete, de manera no invasiva, de bajo coste y altamente eficaz.

13. De los caracteres de composición de la carne, los lípidos y la humedad presentaron heredabilidad baja-media, mientras que no presentaron determinación genética aditiva el colágeno y la proteína. Sin embargo, estos dos últimos caracteres mostraron correlaciones genéticas positivas con el crecimiento, permitiendo su mejora indirecta a través de la longitud.

14. Por primera vez en dorada, la grasa muscular es medida a través del *Fish Fatmeter* y el NIR, presentando el primero una heredabilidad alta y mucho mayor que el segundo, ambos con una correlación genética altísima. Todo lo cual propone al sistema *Fish Fatmeter* como un método no invasivo, más económico y rápido para llevar a cabo selección para la calidad de la carne.

15. Por primera vez en dorada, se ha estimado la heredabilidad de la textura a través de la fuerza máxima sobre el pez entero, mostrando determinación genética aditiva.

16. Los resultados del presente estudio ponen de manifiesto que para todos los caracteres analizados de crecimiento, de la canal, de calidad de la carne y del pez, no existe interacción genotipo-ambiente, entre tanque (ICCM) y jaula (CANEXMAR) en Canarias, ni entre sistemas de cultivo a escala nacional (jaulas insulares y continentales y esteros) para caracteres de crecimiento y deformidad.

17. Las estimas de parámetros genéticos de este estudio sugieren que la inclusión de caracteres como *A/Ca* (alto de cabeza), el FF, la grasa visceral, y la deformidad de columna, como criterios en programas de mejora genética de dorada, podrían liderar una rápida respuesta a la selección mejorando el crecimiento, el rendimiento y la calidad del pez y de la carne.

5. BIBLIOGRAFÍA

5. BIBLIOGRAFÍA

- Abdallah, H., Gilbey, J., 2005. Genetic diversity and differentiation of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) revealed by DNA microsatellites. *Aquaculture Research*, 36, 1450-1457.
- Adcock, G.J., Bernal Ramirez, 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 Biology*, 56, 1283-1287.
- Afonso, J. M., 1996. Programas de Selección Aplicados en Peces. I.T.E.A. 92a,177-184.
- Afonso, J.M., Montero, D., Robaina, L., Astorga, N., Izquierdo, M.S., Ginés, R., 2000. Association of a lordosis-scoliosis-kyphosis deformity in gilthead seabream (*Sparus aurata*) with family structure. *Fish Physiology and Biochemistry*, 22, 159-163.
- Afonso, J.M., Roo, F. J., 2009. Anomalías morfológicas en peces cultivados: heredabilidad y selección. En: *Genética y genómica en acuicultura*. Coord., Martínez, P., Figueras, A. Ed. Publicaciones Científicas y Tecnológicas de la Fundación Observatorio Español de Acuicultura, Madrid, p. 215-240. ISBN, 978-84-00-085537, 527 pp.
- 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.
- Andrades, J.A., Becerra, J., Fernández-Llebreg, P., 1996. Skeletal deformities in larval, juvenile and adult stages of cultured gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.). *Aquaculture*, 141, 1 -11.
- Antonello, J., Massault, C., Franch, R., Haley, Ch., Pellizzari, C., Bovo, G., Patarnello, T., De Koning, D.J., Bargelloni, L., 2009. Estimates of heritability and genetic correlation for body length and resistance to fish pasteurellosis in the gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.). *Aquaculture*, 298, 29–35.
- AOAC,1990. Official Methods of Analysis, Vols I and II. 15th edition. Association of Official Analytical Chemists, Arlington,VA, USA. 1298 pp.
- APROMAR, 2012. Fish marine aquaculture in Spain. (<http://www.apromar.es>).
- Argyrokastritis, A., Pasparaki, A., Kokkinaki, M., Moschonas, N.K., 2002. Gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.) genome survey, unpublished (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)
- Arias, A., 1980. Crecimiento, régimen alimentario y reproducción de la dorada (*Sparus aurata* L.) y del róbalo (*Dicentrarchus labrax* L.) en los esteros de Cádiz. *Investigación Pesquera*, 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. *Aquaculture Research*, 36, 733-738.
- Astorga, N., Zamorano, M.J., Toro, M.A., García Cortés, L.A., Montero, D., Afonso, J.M., 2004. Heredabilidad del carácter presencia o ausencia de deformaciones esqueléticas en dorada (*Sparus aurata* L.). *ITEA*, 100A, 3, 256-250.
- Azzaydi, M., Madrid, J.A, Zamora, S., Sanchez-Vazquez F.J., Martinez, F.J., 1997. Estudio comparativo de la eficacia de tres sistemas de alimentación sobre el crecimiento y utilización nutritiva de la dieta en la lubina (*Dicentrarchus labrax* L.). *Actas del VI Congreso Nacional de Acuicultura*, 9-11 de Julio de 1997, Cartagena, España.

- Baffoun, A., 2012. Evaluación de los sistemas de marcaje Nanotec Tag y Coded Wire Tag en alevines de dorada (*Sparus aurata* L.): efectos sobre el crecimiento, la supervivencia y el bienestar de los peces. Tesina de Master Oficial en Cultivos Marinos de la Universidad de Las Palmas de Gran Canaria, bienio 2010-2012. 90 pp.
- Bangera, R., Ødegård J., Præbel, A.K., Mortensen, A., Nielsen, H.M., 2011. Genetic correlations between growth rate and resistance to vibriosis and viral nervous necrosis in Atlantic cod (*Gadus morhua* L.). *Aquaculture*, 317, 67–73.
- Banks, M., Rashbrook, V., Calavetta, M., Dean, Ch., Hedgecock, D., 2000. Analysis of microsatellite DNA resolves genetic structure and diversity of chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*) in California's Central Valley. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 57, 915-927.
- Bardon A., Vandeputte, M., Dupont-Nivet, M., Chavanne, H., Haffray, P., Vergnet A., Chatain, B., 2009. What is the heritable component of spinal deformities in the European sea bass (*Dicentrarchus labrax*)? *Aquaculture*, 294, 194–201.
- Batargias, C., Dermitzakis, E., Magoulas, A., Zouros, E., 1999. Characterization of six polymorphic microsatellite markers in gilthead seabream, *Sparus aurata*. *Molecular Ecology*, 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. Fifth Panhellenic Congress of Oceanography and Fisheries, Kavala, Grecia, 15-18.
- Bentsen, H.B., Gjerde, B., Nguyen, N.H., Rye, M., Ponzoni, R.W., Palada de Vera, M.S., Bolivar H.L., Velasco, R.R., Danting, J.C., Dionisio, E.E, Longalong, F.M., Reyes, R.A., Abella, T.A., Tayamen, M.M., Eknath, A.E., 2012. Genetic improvement of farmed tilapias: Genetic parameters for body weight at harvest in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) during five generations of testing in multiple environments. *Aquaculture*, 338-341, 56–65.
- Ben-Tuvia, A., 1979. Studies of the population and fisheries of *Sparus aurata* in the Bardawil Lagoon, eastern Mediterranean. *Investigación Pesquera*, 43, 43-67.
- Beraldo, P., Pinosa, M., Tibaldi, E., Canavese, B., 2003. Abnormalities of the operculum in gilthead sea bream (*Sparus aurata*): morphological description. *Aquaculture*, 220, 89–99.
- Bernatchez, L., Duchesne, P., 2000. Individual-based genotype analysis in studies of parentage and population assignment: how many loci, how many alleles? *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 57, 1-12.
- Berzaghi, P., Riovanto, R., 2009. Near infrared spectroscopy in animal science production: principles and applications. *Italian Journal of Animal Science*, 8, 3, 39-62.
- Blanco, G., Borrell, Y., Bernardo, D., Vázquez, E., Asturiano, J., Sánchez, J. A., 2007. The use of microsatellites for optimizing broodstocks in a hatchery of gilthead seabream (*Sparus aurata* L.) *Aquaculture*, 10.1016/j.aquaculture 2007.07.035
- Blonk, R.J.W, Komen, J., Tenghe, A., Kamstra, A., van Arendonk, J.A.M., 2010. Heritability of shape in common sole, *Solea solea*, estimated from image analysis data. *Aquaculture*, 307, 6–11.
- Blouin, M.S., Parsons, M., Lacaille, V., Lotz, S., 1996. Use of microsatellite loci to classify individuals by relatedness. *Molecular Ecology*, 5, 393-401.
- Boglione C., Costa C., 2011. Skeletal deformities and juvenile quality. In: Sparidae: Biology and Aquaculture of Gilthead Sea Bream and Other Species. Eds. Pavlidis, M., Mylonas, C., Blackwell, Oxford, Reino Unido, pp. 233–294. ISBN, 978-1-4051-9772-4.

- Boglione, C., Gagliardi, F., Scardi, M., Cataudella, S., 2001. Skeletal descriptors as quality assessment in larvae and post-larvae of wild-caught and hatchery-reared gilthead sea bream (*Sparus aurata* L. 1758). *Aquaculture*, 192, 1-22.
- 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. *Molecular Ecology*, 13, 3261–3273.
- Borrell Y., Álvarez, J., Vázquez, E., Sánchez Prado, J. A., Fernández-Pato, C., Martínez-Tapia, C., Blanco G., 2002. Aplicación de marcadores microsatélites a los programas de cultivo del rodaballo (*Scophthalmus maximus* L., 1758). *Boletín Instituto Español Oceanografía* 18, 203-209.
- Borrell, Y., Álvarez, J., Vázquez, E., Fernández, C., Martínez, C., Sánchez, J.A., Blanco, G., 2004. Applying microsatellites to the management of turbot stocks (*Scophthalmus maximus* L.) in hatcheries. *Aquaculture*, 241, 133–150.
- Borrell, Y., Blanco, G., Vázquez, E., Piñera, J.A., Giménez, G., Estévez, A., Sánchez, J.A., 2008. Assessing the spawning season in common dentex (*Dentex dentex*) using microsatellites. *Aquaculture Research*, 2008, 39, 1258-1267.
- Borrell, Y., Carleos, C.E., Asturiano, J.F., Bernardo, D., Vázquez, E., Corral, N., Sánchez, J.A., Blanco, G., 2007. Using microsatellites and a combinatorial optimization approach for avoiding inbreeding in the acquisition of gilthead seabream (*Sparus aurata* L.) broodstocks for hatcheries. *Aquaculture*, 269, 200–210.
- Borrell, Y., Gallego, V., García-Fernández, C., Mazzeo, I., Pérez, L., Asturiano, J.F., Carleo, C., Vázquez, E., Sánchez, J.A., Blanco, G., 2011. Assessment of parental contributions to fast- and slow-growing progenies in the sea bream *Sparus aurata* L. using a new multiplex PCR. *Aquaculture*, 314, 58-65.
- Botstein, D., White, R.L., Skolnick, M., Davis, R.W., 1980. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *American Journal of Human Genetics*, 32, 314-331.
- Bouza, C., Presa, P., Castro, J., Sánchez, L. y Martínez, P., 2002. Allozyme and microsatellite diversity in natural and domestic populations of turbot (*Scophthalmus maximus*) in comparison with other Pleuronectiformes. *Canadian journal of fisheries and aquatic sciences*, 59, 1460-1473.
- Brett, J.R., 1979. Environmental factors and growth. En "Fish Physiology, vol. VIII" (W.S. Hoar, D.J. Randall y J.R. Brett, eds.), Academic Press, Nueva York, 599-675 pp.
- Brosnan, T., Sun, D-W., 2004. Improving quality inspection of food products by computer vision—a review. *Journal of Food Engineering* 61, 3–16.
- Brown, R.C., Tsalavouta, M., Terzoglou, V., Magoulas, A., McAndrew, B.J., 2005b. Additional microsatellites for *Sparus aurata* and cross-species amplification within the Sparidae family. *Molecular Ecology*, 5, 605-607.
- Brown, R.C., Woolliams, J.A., MacAndrew, B.J., 2005a. Factors influencing effective population size in commercial population of gilthead seabream, *Sparus aurata*. *Aquaculture*, 247, 219-225.
- 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., Bouza, C., Presa, P., Pino-Querido, A., Riaza, A., Ferrerio, I., Sanchez, L., Martinez, L.M., 2004. Potential sources of error in parentage assessment of turbot (*Scophthalmus maximus*) using microsatellite loci. *Aquaculture*, 242, 119-135.

Bibliografía

- Castro, J., Pino, A., Hermida, M., Bouza, C., Rianza, A., Ferreira, I., Sánchez, L., Martínez, P., 2006. A microsatellite marker tool for parentage assessment in gilthead seabream (*Sparus aurata*). *Aquaculture*, 261, 1194-1203.
- 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*). *Aquaculture*, 272, S1, S210–S216.
- 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.
- Chapuis, M.P., Estoup, A., 2007. Microsatellite null alleles and estimation of population differentiation. *Molecular Biology and Evolution*, 24, 621-631.
- Chatain, B., 1994. Abnormal swimbladder development and lordosis in sea bass (*Dicentrarchus labrax*) and sea bream (*Sparus auratus*). *Aquaculture*, 119, 371-379.
- 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.
- Cibert, C., Fermon, Y., Vallod, D., Meunier, F.J., 1999. Morphological screening of carp *Cyprinus carpio*: relationship between morphology and fillet yield. *Aquatic Living Resources* 12, 1, 1–10.
- Cobcroft, J. M., Pankhurst, P. M., Sadler, J., Hart, P., 2001. Jaw development and malformation in cultured striped trumpeter *Latris lineata*. *Aquaculture*, 199, 267-282.
- Cobcroft, J., Pankhurst P., Poortenaar C., Hickman B., Tait M., 2004. Jaw malformation in cultured yellowtail kingfish (*Seriola lalandi*) larvae. *New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research*, 38, 1, 67-71.
- CONAFE, 2012. <http://www.conafe.com/>.
- Costa, C., Antonucci, F., Pallottino, F., Aguzzi, J., Sun, D-W, Menesatti, P. 2011. Shape Analysis of Agricultural Products: A Review of Recent Research Advances and Potential Application to Computer Vision. *Food and Bioprocess Technology*, 4, 673-692.
- Costa, C., Vandeputte, M., Antonucci, F., Boglione, C. Menesatti, P., Cenadelli, S. Parati, K., Chavanne, H., Chatain, B., 2010. Genetic and environmental influences on shape variation in the European sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Biological Journal of the Linnean Society*, 101, 427–436.
- Coughlan, J., Imsland, A., Galvin, P., Fitzgerald, R., Naevdal, G., Cross, T., 1998. Microsatellite DNA variation in wild populations and farmed strains of turbot from Ireland and Norway: a preliminary study. *Journal of fish biology*, 52, 916-922.
- Dakin, E.E., Avise, J.C., 2004. Microsatellite null alleles in parentage analysis. *Heredity*, 93, 504-509
- De Innocentiis, S., Miggiano, E., Ungaro, A., Livia, S., Solab, L., Crosetta, D., 2005. Geographical origin of individual breeders from gilthead sea bream (*Sparus aurata*) hatchery broodstocks inferred by microsatellite profiles. *Aquaculture*, 247, 227– 232
- De Wolf, T., Courtens, V., Capiferri, U., Pirone, A., Lenzi, C., Lenzi, F., 2004. The influence of light conditions on the operculum recovery of sea bream (*Sparus aurata* L.) fry. *Book of abstracts. Aquaculture Europe, Biotechnologies for quality, Barcelona, Spain 20–23*, 292 pp.

- Delghandi, M., Mortensen, A., Westgaard, J.I., 2003. Simultaneous analysis of six microsatellite markers in Atlantic cod (*Gadus morhua*): a novel multiplex assay system for use in selective breeding studies. *Marine Biotechnology*, 5, 141-148.
- Dempster, R.E., Lerner, I.M., 1950. Heritability of threshold characters. *Genetics* 35, 212 pp.
- Desvignes, J., Durand, B., 2001. Genetic variability in reared stocks on common carp (*Cyprinus carpio*) based on allozymes and microsatellites. *Aquaculture*, 194, 291-301.
- Divanach, P., Boglione, C., Menu, B., Koumoundouros, G., Kentouri, M., Cataudella, S., 1996. Abnormalities in finfish mariculture: and overview of the problem, causes and solutions. In: Chatain, B., Saroglia, M., Sweetan, J., Lavens, P. (Eds.), *Sea Bass and Sea Bream Culture: Problems and Prospects*. Oostende, Belgium. Eur. Aqu. Soc., 45, p. 6.
- Divanach, P., Kentouri, M., 1983. The influence of initial tropic conditions on oil globule resorption, growth and survival of gilthead sea bream *Sparus aurata* larvae reared in extensive breeding. *Aquaculture*, 35, 43-55.
- Divanach, P., Papandroulakis, N., Anastasiadis, P., Koumoundouros, G., Kentouri, M., 1997. Effect of water currents on the development of skeletal deformities in sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) with functional swimbladder during postlarval and nursery phase. *Aquaculture* 156, 145–155.
- Dunham, R.A., 2011. *Aquaculture and Fisheries Biotechnology: Genetic Approaches*. 2nd edition. Ed. CAB International, Oxfordshire, United Kingdom, 495 pp.
- Dunham, R.A., Majumdar, K., Hallerman, E., Bartley, D., Mair, G., Hulata, G., Liu, Z., Pongthana, N., Bakos, J., Penman, D., Gupta, M., Rothlisberg, P. & Hoerstgen-Schwark, G., 2001. Review of the status of aquaculture genetics. In R.P. Subasinghe, P. Bueno, M.J. Phillips, C. Hough, S.E. McGladdery & J.R. Arthur, eds. *Aquaculture in the Third Millennium*. Technical Proceedings of the Conference on Aquaculture in the Third Millennium, Bangkok, Thailand, 20-25. NACA, Bangkok and FAO, Rome,. pp 137-166.
- Doupé, R.G., Lymbery, A.J., 2005. Genetic covariation in production traits of sub-adult black bream *Acanthopagrus butcheri* after grow-out. *Aquaculture Research*, 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.
- Falconer, D.S., Mackay, T.F.C., 1996. *Introducción a la genética cuantitativa*. Editorial Acribia, Zaragoza, pp. 469.
- FAO, 2006. *Estadísticas de pesca y acuicultura*. Roma, Italia.
- FEAP, 2012. *Federación Europea de Productores de Acuicultura*. Production Reports of the Members Associations of the FEAP 2002-2011.
- Fernández, I., Hontoria, F., Ortiz-Delgado, J.B., Kotzamanis, Y., Estévez, A., Zambonino-Infante, J.L., Gisbert, E., 2008. Larval performance and skeletal deformities in farmed gilthead sea bream (*Sparus aurata*) fed with graded levels of vitamin A enriched rotifers (*Brachionus plicatilis*) *Aquaculture* 283, 102 -115.
- Fernández, I., Ortiz-Delgado, J.B., Sarasquete, C., Gisbert, E., 2012. Vitamin A effects on vertebral bone tissue homeostasis in gilthead sea bream (*Sparus aurata*) juveniles. *Journal of applied ichthyology*, 28, 419–426.

- Folkestad, A., Wold, J.P., Rørvik, K-A., Tschudi, J., Haugholt, K.H., Kolstad, K., Mørkøre, T., 2008. Rapid and non-invasive measurements of fat and pigment concentrations in live and slaughtered Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Aquaculture* 280, 129–135.
- 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.
- Fraser, M.R., Nys, R., 2005. The morphology and occurrence of jaw and operculum deformities in cultured barramundi (*Lates calcarifer*) larvae. *Aquaculture*, 250, 496–503
- Funes, V., Zuasti, E., Catanese, G., 2004. Isolation and characterization of ten microsatellite loci for Senegal sole (*Solea senegalensis*). *Molecular Ecology Notes*, 4, 339–341.
- Gagneux, P., Boesch, C., Woodruff, D.S., 1997. Microsatellite scoring errors associated with noninvasive genotyping based on nuclear DNA amplified from shed hair. *Molecular Ecology*, 6, 861-868.
- Galeotti, M., Beraldo, P., De Dominis, S., D'Angelo, L., Ballestrazzi, R., Musetti, R., Pizzolito, S., Pinosa, M., 2000. A preliminary histological and ultrastructural study of opercular anomalies in gilthead sea bream larvae (*Sparus aurata*). *Fish physiology and biochemistry*, 22, 151–157.
- Galloway, T.F., Kjorsvik, E., Kryvi, H., 1999. Muscle growth in yolk sac larvae of Atlantic halibut as influenced by temperature in the eggs and yolk-sac stage. *Journal Fish Biology*, 55, 26-43.
- Gapasin, R.S.J., Duray, M.N., 2001. Effects of DHA-enriched live food on growth, survival and incidence of opercular deformities in milkfish (*Chanos chanos*). *Aquaculture* 193, 49–63.
- Georgakopoulou, E., Katharios, P., Divanach, P., Koumoundouros, G., 2010. Effect of temperature on the development of skeletal deformities in Gilthead seabream (*Sparus aurata* Linnaeus, 1758). *Aquaculture*, 308, 13–19.
- Giménez, G., Estévez, A., 2005. Effects of two culturing techniques on the growth, survival and larval quality of *Dentex dentex* (Linnaeus). Larvi '05–fish & Shellfish Larviculture Symposium. C.I. Hendry, G. Van Stappen, M. Wille and P. Sorgeloos (Eds). European Aquaculture Society, Special Publication No. 36, Oostende, Belgium.
- Giménez, G., Estévez, A., Lahnsteiner, F., Zecevic, B., Bell, J.G., Henderson, R.J., Piñera, J.A., Sánchez-Prado, J.A., 2006. Egg quality criteria in common dentex (*Dentex dentex*). *Aquaculture*, 260, 232-243.
- 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 sea bream (*Sparus aurata* L.) as a result of interference in sexual maturation by different photoperiod regimes. *Aquaculture Research*, 34, 73-83.
- Ginés, R., Afonso, J.M., Argüello, A., Zamorano, M.J., López J.L., 2004a. The effects of long-day photoperiod on growth, body composition and skin colour in immature gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.). *Aquaculture Research*, 35, 1207-1212.
- Ginés, R., Palacio, M., Zamorano, M.J., Argüello, A., López, J.L., Afonso, J.M., 2002. Starvation before slaughtering as a tool to keep freshness attributes in gilthead sea bream (*Sparus aurata*). *Aquaculture International*, 10, 379–389.

- Ginés, R., Valdimarsdottir, T., Sveinsdottir, K., Thorarensen, H., 2004b Effects of rearing temperature and strain on sensory characteristics, texture, colour and fat of Arctic charr (*Salvelinus alpinus*). *Food Quality and Preference* 15, 177–185.
- Gjedrem, T., 1997. Flesh quality improvement in fish through breeding. *Aquaculture International*, 5, 197-206.
- Gjedrem, T., 2000. Genetic improvement of cold-water fish species. *Aquaculture Research*. 31, 25–34.
- Gjedrem, T., 2010. The first family-based breeding program in aquaculture. *Review in Aquaculture*, 2, 2–15.
- Gjedrem, T., 2012. Genetic improvement for the development of efficient global aquaculture: A personal opinion review. *Aquaculture*, 344-349, 12–22.
- Gjedrem, T., Robinson, N., Morten, R., 2012. The importance of selective breeding in aquaculture to meet future demands for animal protein: A review. *Aquaculture*, doi:10.1016/j.aquaculture.2012.04.008.
- Gjedrem, T., 2005. *Selection and Breeding Programs in Aquaculture*. Ed. Gjedrem, T., Springer, Dordrecht, The Netherlands. 364 pp.
- Gjerde, B., Pante, M.J., Baevefjord, G., 2005. Genetic variation for a vertebral deformity in Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Aquaculture*, 244, 77-87.
- 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., 2006. *Practical Genetics in Israeli Mariculture: History and Present Status*. *The Israeli Journal of Aquaculture- Bamidgeh*, 58, 4.
- 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., Taylor, K.D.A., Hole, M., 2002. Comparison of wild and cultured gilthead sea bream: composition, appearance and seasonal alterations. *International Journal of Food Science and Technology*, 37, 477-484.
- Groeneveld, E., Kovač, M., Mielenz, N., 2010. *VCE User's Guide and Reference Manual Version 6.0* (<ftp://ftp.tzv.fal.de/pub/vce6/doc/vce6-manual-3.1-A4.pdf>).
- 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.
- Hearne, C.M., Ghosh, S., Todd, J.A., 1992. Microsatellites for linkage analysis of genetic traits. *Trends in Ecology and Evolution*, 8, 288, 94.
- 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., O'Reilly, P., Doyle, R., Wright, J., 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.
- Hoffman, J.I., Amos, W., 2005. Microsatellite genotyping errors: detection approaches, common sources and consequences for parental exclusion. *Molecular Ecology*, 14, 599-612.

- Huidobro, A., Pastor, A., Tejada, M., 2000. Quality Index Method development for raw gilthead seabream (*Sparus aurata*). *Journal of Food Science*, 65, 1202-1205.
- Iles, T.D., Wood, R.J., 1965. The fat /water relationship in North Sea herring (*Clupea harengus*) and its possible significance. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 45, 353-366
- ISAG 2001/2002. <http://www.isag.us/comptest.asp>, www.isag.org.uk.
- 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., Socorro, J., Roo, J., 2010. Review: Studies on the appearance of skeletal anomalies in red porgy: effect of culture intensiveness, feeding habits and nutritional quality of live preys. *Journal of Applied Ichthyology*. 26, 320–326.
- Jamieson, A., Taylor, S.C.S., 1997. Comparisons of three probability formulae for parentage exclusion. *Animal Genetics*, 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*). *Molecular Ecology Notes*, 6, 1269–1271.
- Johnston, I.A., Alderson, R., Sandham, C., Dingwall, A., Mitchell, D., Selkirk, C., Nickell, D., Baker, R., Robertson, B., Whyte, D., Springate, J., 2000. Muscle fibre density in relation to the colour and texture of smoked Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Aquaculture*, 189, 335–349.
- Jover, M., 2007. Alternativas de futuro para la producción de la dorada (*Sparus aurata*). XI Congreso Nacional de Acuicultura, Vigo, 1337-1342.
- Jørgensen, E.H., Jobling, M., 1992. Feeding behaviour and effect of feeding regime on growth of Atlantic salmon, *Salmo salar*. *Aquaculture*, 101, 135-146.
- Kalinowski, S.T., Taper, M.L., Marshall, T.C., 2007. Revising how the computer program CERVUS accommodates genotyping error increases success in paternity assignment. *Molecular Ecology*, 16, 1099-1106.
- Karahan, B., Chatain, B., Chavanne, H., Vergnet, A., Bardon, A., Haffray, P., Dupont-Nivet, M., Vandeputte, M., 2012. Heritabilities and correlations of deformities and growth-related traits in the European sea bass (*Dicentrarchus labrax*, L) in four different sites. *Aquaculture Research*, 1–11.
- 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. *Journal of Animal Science*, 85, 3218-3227.
- Kause, A., Quinton, C., Airaksinen, S., Ruohonen, K., Koskela, J., 2011. Quality and production trait genetics of farmed European whitefish, *Coregonus lavaretus*. *Journal of Animal Science*, 89, 959-971.
- Kause, A., Ritola, O., Paananen, T., Eskelinen, U., Mäntysaari, E., 2003. Big and beautiful? Quantitative genetic parameters for appearance of large rainbow trout. *J. Fish Biol.* 62, 610–622.
- Kause, A., O. Ritola, T. Paananen, E. Mäntysaari, and U. Eskelinen. 2002. Coupling body weight and its composition: A quantitative genetic analysis in rainbow trout. *Aquaculture* 211, 65–79.
- Kause, A., Ritola, O., Paananen, T., Wahlroos, H., Mäntysaari, E.A., 2005. Genetic trends in growth, sexual maturity and skeletal deformations, and rate of inbreeding in a breeding programme for rainbow trout. *Aquaculture*, 247, 177–187.
- Kause, A., Stien, L.H., Rungruangsak-Torrisen, K., Ritola, O., Ruohonen, K., Kiessling, A., 2008. Image analysis as a tool to facilitate selective breeding of quality traits in rainbow trout. *Livestock science*, 114, 315–324.

- Kihara, M., Ogata, S., Kawano, N., Kubota, I., Yamaguchi, R., 2002. Lordosis induction in juvenile red sea bream *Pagrus major* by high swimming activity. *Aquaculture* 212, 149-158.
- Knibb, W., Gorshkova, G., Gorshkov, S., 1998. Selection and crossbreeding in Mediterranean cultured marine fish (Review). *Cahiers Options Méditerranéennes*, 34, 47-60.
- Knibb, W.R., Gorshkova, G., Gorshkov, S., 1997. Selection for growth in the gilthead seabream (*Sparus aurata*). *The Israeli Journal of Aquaculture-Bamidghe*, 49, 57-66.
- Kocour, M., Linhart, O., Vandeputte, M., 2006. Mouth and fin deformities in common carp: is there a genetic basis? *Aquac. Res.* 37, 419–422.
- Kocour, M., Mauger, S., Rodina, M., Gela, D., Linhart, O., Vandeputte, M., 2007. Heritability estimates for processing and quality 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.
- Koumoundouros, G., Divanach, P., Kentouri, M., 2001. The effect of rearing conditions on development of saddleback syndrome and caudal fin deformities in *Dentex dentex* L. *Aquaculture*, 200, 285-304.
- Koumoundouros, G., Oran, G., Divanach, P., Stefanakis, S., Kentouri, M., 1997. The opercular complex deformity in intensive gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.) larviculture. Moment of apparition and description. *Aquaculture*, 156, 165-177.
- Lall, S.P., Lewis-McCrea, L., 2007. Role of nutrients in skeletal metabolism and pathology in fish, an overview. *Aquaculture*, 267, 3–19.
- Launey, S., Krieg, F., Haffra, P., Bruant, J.S., Vanniers, A., Guyomard, R. 2003. Twelve new microsatellite markers for gilthead seabream (*Sparus aurata* L.): characterization, polymorphism and linkage. *Molecular Ecology*, 3, 457-459.
- Lee-Montero, I., Navarro, A., Borrell, Y., García-Celdran, M., Martín, N., Negrín-Báez, D., Sánchez, J.A., Armero, E., Berbel, C., Zamorano, M.J., Sánchez, J., Estévez, A., Ramis, G., Manchado, M., Afonso, J.M. Development of the first standardized panel of two new microsatellites multiplex PCRs for gilthead seabream (*Sparus aurata* L.). *Animal Genetics* (en prensa).
- Lipinski, M.J., Amigues, Y., Blasi, M., Broad, T.E., Cherbonnel, C., Cho, G.J., Corley, S., Daftari, P., Delattre, D.R., Dileanis, S., Flynn, J.M., Grattapaglia, D., Guthrie, A., Harper, C., Karttunen, P.L., Kimura, H., Lewis, G.M., Longeri, M., Meriaux, J.-C., Morita, M., Morrin-O'Donnell, R.C., Niini, T., Pedersen, N.C., Perrotta, G., Polli, M., Rittler, S., Schubbert, R., Strillacci, M.G., Van Haeringen, H., Van Haeringen, W., Lyons, L.A., 2007. An international parentage and identification panel for the domestic cat (*Felis catus*). *Animal Genetics*, 38, 371-377.
- Liu, Z.J., Cordes, J.F., 2004. DNA marker technologies and their applications in aquaculture genetics. *Aquaculture*, 238, 1-37.
- Lo Presti R., Lisa C., Di Stasio L., 2009. Molecular genetics in aquaculture. *Italian Journal of Animal Science*, 8, 299-313.
- Luna, L., Fernández, J., Incera, M.T., Duque, D, Fernández, J., García, R., Fernández, C., 2006. La demanda de filete de dorada en el mercado Español. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. ISBN: 84-491-0707-5.

- Lynch, M., Walsh, B., 1998. Genetics and Analysis of quantitative traits. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts, USA, 980 pp.
- Markoulatos, P., Siafakas, N., Moncany, M., 2002. Multiplex Polymerase Chain Reaction: A Practical Approach. Journal of Clinical Laboratory Analysis, 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. Molecular Ecology, 7, 639-655.
- Matos, E., Gonçalves, Am., Nunes, M.L., Dinis, M.T., Dias, J., 2010. Effect of harvesting stress and slaughter conditions on selected flesh quality criteria of gilthead seabream (*Sparus aurata*). Aquaculture 305, 66–72.
- McKay, L.R., Gjerde, B., 1986. Genetic variation for a spinal deformity in Atlantic salmon, *Salmo salar*. Aquaculture, 52, 263–272.
- McKelvey, K., Schwartz, M., 2004. Genetics errors associated with population estimation using non-invasive molecular tagging: problems and new solutions. Journal of wildlife management, 68, 3, 439-448.
- McLeod, B., 2003. Comparing Lamb Marketing Methods. AgFact A3.8.6. NSW Agriculture, Australia.
- McPhee, C.P., Brennan, P.J., Cuncalfe., F., 1979. Genetic and phenotypic parameters of Australian Large White and Landrace boars performance tested when offered fed *ad libitum*. Animal Production, 28, 79.
- McPherson, L. R., Slotte, A., Kvamme, C., Meier, S., Marshall, C.T., 2011. Inconsistencies in measurement of fish condition: a comparison of four indices of fat reserves for Atlantic herring (*Clupea harengus*). ICES Journal of Marine Science, 68, 1, 52–60, doi:10.1093/icesjms/fsq148.
- Micale, V., Perdichizzi, F., 1990. Gonadal responsiveness to photoperiod extension in captivity-born *Sparus aurata* (L.) during the male phase. Bollettino di zoologia, 57, 21-26.
- Miquel, C., Bellemain, E., Poillot, C., Bessière, J., Durand, A., Taberlet P., 2006. Quality indexes to assess the reliability of genotypes in studies using noninvasive sampling and multiple-tube approach. Molecular Ecology Notes, 6, 985-988.
- Montero, D., Robaina, L., Tort, L., Afonso, J.M., Fernández-Palacios, H., Izquierdo, M.S., 2001. Selective breeding for stress tolerance in gilthead seabream *Sparus aurata*. Aquaculture 2001, Orlando, Florida, USA.
- Morel, C., Adriaens, D., Boone, M., De Wolf, T., Van Hoorebeke, L., Sorgeloos, P., 2010. Visualizing mineralization in deformed opercular bones of larval gilthead sea bream (*Sparus aurata*). Journal Applied Ichthyology. 26, 278–279.
- Moretti, A., Pedini, M.F.C., Citolin, G., Guidastrì, R., 1999. Manual on hatchery production of Seabass an gilthead seabream. Vol 1. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Roma.
- Murasaw, N., Kuchida, K., Osawa, T., Hori, T., Kato, K., 2008. Image analytic characteristics for marbling of rib eye divided into four areas and their genetic parameters in Japanese Black steers. Nihon Chikusan Gakkaiho, 79, 3, 343-351.
- 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., Lee-Montero, I., Negrín-Báez, D., Santana, D., Soula, M., Zamorano, M.J., A., Morales, A., Ferrer, M.A., Afonso, J.M. Development of an image analysis fully-automated system for determination of 30 fish morphometric traits and its application in aquaculture. En preparación.

- Navarro, A., Oliva, V., Zamorano, M.J., Gines, R., Izquierdo, M.S., Astorga, N., Afonso, J.M., 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.
- Navarro, A., Zamorano, M.J., Hildebrandt, S., Ginés, R., Aguilera, C., Afonso, J.M., 2009a. Estimates of heritabilities and genetic correlations for growth and carcass traits in gilthead seabream (*Sparus auratus* L.), under industrial conditions. *Aquaculture*, 289, 225-230.
- Navarro, A., Zamorano, M.J., Hildebrandt, S., Ginés, R., Aguilera, C., Afonso, J.M., 2009b. Estimates of heritabilities and genetic correlations for body composition traits and G×E interactions, in gilthead seabream (*Sparus auratus* L.) *Aquaculture*, 295, 183–187.
- Neff, B.D., Fu, P., Gross, M.R., 2000. Microsatellite multiplexing in fish. *Transactions of the American Fisheries Society*, 129, 584-593.
- Nei, M., 1987. *Molecular Evolutionary Genetics*. Columbia University Press, New York. 512 pp.
- Neira, R., 2010. Breeding in aquaculture species: genetic improvement programs in developing countries. 9th World Congress on Genetics Applied to Livestock Production, Leipzig, Germany, August 1–6, p. 8.
- 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.
- Neumaier, A., Groeneveld, E., 1998. Restricted maximum likelihood estimation of covariances in sparse linear models. *Genetics selection evolution*, 1(30), 3–26.
- Nguyen, N.H., Khaw, H.L., Ponzoni, R.W., Hamzah, A., Kamaruzzaman, N., 2007. Can sexual dimorphism and body shape be altered in Nile Tilapia by genetic means? *Aquaculture* 272S1, S36–S48.
- Nguyen, N.H., Ponzoni, R.W., Abu-Bakar, K.R., Hamzah, A., Khaw, H.L., Yee, H.Y., 2010a. Correlated response in fillet weight and yield to selection for increased harvest weight in genetically improved farmed tilapia (GIFT strain), *Oreochromis niloticus*. *Aquaculture*, 305, 1–5.
- Nguyen, N.H., Ponzoni, R.W., Hamzah, A., Yee, H.Y., Abu-Bakar, K.R., Khaw, H.L., 2010b. Genetics of flesh quality in fish. *Proceedings of the 8th World Congress on Genetics Applied to Livestock Production*, 1–6 August, Leipzig, Germany.
- Nielsen H.M., Ødegård J., Olesen I., Gjerde B., Ardo L., Jeney G., Jeney Z., 2010. Genetic analysis of common carp (*Cyprinus carpio*) strains I: Genetic parameters and heterosis for growth traits and survival. *Aquaculture*, 304, 14–21
- Nielsen, D., Hyldig, G., Nielsen, J., Nielsen, H.H., 2005. Lipid content in herring (*Clupea harengus* L.)—influence of biological factors and comparison of different methods of analyses: solvent extraction, Fatmeter, NIR and NMR. *LWT* 38 (2005) 537–548.
- Norris, A., Bradley, D., Cunningham, E., 1999. Microsatellite genetic variation between and within farmed and wild Atlantic salmon (*Salmo salar*) populations. *Aquaculture*, 180, 247-264.
- Olesen, I., Gjedrem, T., Bentsen, H.B., Gjerde, B., Rye, M., 2003. Breeding programs for sustainable aquaculture. *Journal of Applied Aquaculture*, 13, 179-204.
- 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.

Bibliografía

- Oliva, V., Zamorano, M.J., Astorga, N., Ginés, R., Navarro, A., Cavari, B., Funkenstein, B., Afonso, J.M., 2003. Microsatellite diversity in natural populations of *Sparus aurata* L. using interspecific and intraspecific markers.. Genetics in Aquaculture VIII (Proceedings of Genetics in Aquaculture VIII), pp. 138, Puerto Varas, Chile, Noviembre.
- Osawa, T., Kuchida, K., Hidaka S., Kato, T., 2008. Genetic parameters for image analysis traits on *M. longissimus thoracis* and *M. trapezius* of carcass cross section in Japanese Black steers. Journal of Animal Science. 86, 40–46.
- Pérez-Enríquez, R., Takagi, M., Taniguchi, N., 1999. Genetic variability and pedigree tracing of a hatchery-reared stock of red seabream (*Pagrus major*) used for stock enhancement, based on microsatellite DNA markers. Aquaculture, 173, 413-423.
- Perlin, M.W., Lancia, G., See-Kiong, Ng., 1995. Toward fully automated genotyping: genotyping microsatellite markers by deconvolution. American Journal Human Genetics, 57, 1199-1210.
- Piñera, J.A., Bernardo, D., Blanco, G., Vazquez, E., Sanchez, J.A., 2006. Isolation and characterization of polymorphic microsatellite markers in *Pagellus bogaraveo*, and cross-species amplification in *Sparus aurata* and *Dicentrarchus labrax*. Molecular Ecology Notes, 6, 33-35.
- Pompanon, F., Bonin, A., Bellemain, E., Taberlet, P., 2005. Genotyping errors: causes, consequences and solutions. Nature Reviews Genetics, 6, 847-859.
- 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). Molecular Ecology Notes, 6, 527–529.
- Ponzoni, R.W., 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.
- Ponzoni, R.W., Nguyen, N.H., Khaw, H.L., 2007. Investment appraisal of genetic improvement programs in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). Aquaculture, 269, 187–199.
- Ponzoni, R.W., Nguyen, N.H., Khaw, H.L., Ninh, N.H., 2008. Accounting for genotype by environment interaction in economic appraisal of genetic improvement programs in common carp *Cyprinus carpio*. Aquaculture, 285, 47–55.
- Ponzoni, R.W., Nguyen, N.H., Khaw, H.L., Hamzah, A., Abu-Bakar, K.R., Yee, H.Y., 2011. Genetic improvement of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) with special reference to the work conducted by the World Fish Center with the GIFT strain. Reviews In Aquaculture 3, 27–41.
- Porta, J., Porta, J.M., Béjar, J., Álvarez, M.C., 2010. Development of a microsatellite multiplex genotyping tool for the fish Gilthead seabream (*Sparus aurata*): applicability in population genetics and pedigree analysis. Aquaculture Research, 41, 1514-1522.
- Powell, J., White, I., Guy, D., Brotherstone, S., 2008. Genetic parameters of production traits in Atlantic salmon (*Salmo salar*). Aquaculture, 274, 225–231.
- PROGENSA®, 2009. Desarrollo de un Programa Piloto de Mejora Genética en Dorada (*Sparus aurata* L.). Ministerio de Medio Ambiente, Rural y Marino (MARM) Secretaria de la Junta Nacional Asesora de Cultivos Marinos (JACUMAR), España.
- Quillet, E., Le Guilloua, S., Aubinb, J., Fauconneau, B., 2005. Two-way selection for muscle lipid content in pan-size rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Aquaculture 245, 49– 61.

- 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.
- Rachlin, J., Ding, Ch., Cantor, Ch., Kasif S., 2005. MuPlex: multi-objective multiplex PCR assay design. *Nucleic Acids Research*, 33, Web Server issue.
- RamSak, A., Garoia, F., Guarniero, I., Manzini, P., Tinti, F., 2003. Novel polymorphic microsatellite markers for the common pandora (*Pagellus erythrinus*). *Molecular Ecology Notes*, 3, 553–555.
- Regost, C., Arzel, J., Cardinal, M., Rosenlund, G., Kaushik S.J., 2003. Total replacement of fish oil by soybean or linseed oil with a return to fish oil in Turbot (*Psetta maxima*) 2. Flesh quality properties. *Aquaculture*, 220, 737-747.
- Rincón, L., Ginés, R., Hernández, M.D., Álvarez, A., Claret, A., Guerrero, L., 2009. Desarrollo de perfiles sensoriales para la caracterización de tres especies de crianza: dorada, lubina y besugo. XII Congreso Nacional de Acuicultura, Madrid. Libro de actas, pg 634.
- Rius-Vilarrasa, E., Bünger, L., Brotherstone, S. Macfarlane, J.M. Lambe, N.R., Matthews, K.R., Haresign, W., Roehe, R., 2010. Genetic parameters for carcass dimensional measurements from Video Image Analysis and their association with conformation and fat class scores. *Livestock Science* 128, 92–100.
- Rius-Vilarrasa, E., Bünger, L., Maltin, C., Matthews, K.R., Roehe, R., 2009. Evaluation of Video Image Analysis (VIA) technology to predict meat yield of sheep carcasses on-line under UK abattoir conditions. *Meat Science* 82, 94–100.
- Robaina, L., Fernández, A., Vergara, J.M., Izquierdo, M.S., Montero, D., Gimferrer, E., 1997. Efecto de la frecuencia de alimentación sobre el crecimiento, la utilización del alimento y la composición lipídica del músculo de dorada (*Sparus aurata*). Actas del VI Congreso Nacional de Acuicultura, 9-11 de Julio, Cartagena, España.
- Rodríguez, S., Afonso, J.M., Navarro, A. Lee, I., Soula, M., Negrín, D., Zamorano, M.J., 2011. Análisis de segregación de las deformidades de lordosis, opérculo y fusión de vértebras en dorada (*Sparus aurata*, L.) para la búsqueda de QTLs. XIII Congreso Nacional de Acuicultura, 21-24 Noviembre, Barcelona, España.
- Roo, F. J., Hernández-Cruz, C. M., Fernandez-Palacios, H., Izquierdo, M. S., 2005. Development of skeletal deformities in gilthead sea bream (*Sparus aurata*) reared under different larval culture and dietary conditions. In: Larvi'05–fish & Shellfish Larviculture Symposium.c.i. C. Hendry, G. Van Stappen, M. Wille, P. Sorgeloos (Eds). European Aquaculture Society, Oostende, Belgium, Special Publication 36.
- Roo, F.J., Hernández-Cruz, C. M., Socorro, J. A., Fernández- Palacios, H., Montero, D., Izquierdo, M. S., 2009. Effect of DHA content in rotifers on the occurrence of skeletal deformities in red porgy *Pagrus pagrus* (Linnaeus, 1758). *Aquaculture*, 287, 84–93.
- Roo, F.J., Hernández-Cruz, C.M., Socorro, J. A., Fernández- Palacios, H., Izquierdo, M. S., 2010a. Advances in rearing techniques of *Pagrus pagrus*, (Linnaeus, 1758): comparison between intensive and semi-intensive larval rearing systems. *Aquaculture Research*, 41, 433–449.
- Roo, F.J., Hernández-Cruz, C.M., Socorro, J.A., Fernández-Palacios, H., Izquierdo, M.S., 2010c. Occurrence of skeletal deformities and osteological development in red porgy *Pagrus pagrus* larvae cultured under different rearing techniques. *Journal of Fish Biology*, 77, 1309–1324
- Roo, J., Socorro, J., Izquierdo, M.S., 2010b. Effect of rearing techniques on skeletal deformities and osteological development in red porgy *Pagrus pagrus* (Linnaeus, 1758) larvae. *Journal of Applied Ichthyology*, 26, 372–376.

- Roques, S., Galarza, J.A., Macpherson, E., Turner, G.F., Carreras-Carbonell, J., Rico, C., 2007b. Isolation of eight microsatellites loci from the saddled bream, *Oblada melanura* and cross-species amplification in two sea bream species of the genus *Diplodus*. *Conservation Genetics*, 8, 1255-1257.
- Roques, S., Galarza, J.A., Macpherson, E., Turner, G.F., Rico, C., 2007a. 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*). *Molecular Ecology Notes*, 7, 661–663.
- Ruff, B.P., Marchant, J.A., Frost, A.R., 1995. Fish sizing and monitoring using a stereo image analysis system applied to fish farming. *Aquacultural Engineering*, 14, 155-173.
- Rutten, M.J.M., Bovenhuis, H., Komen, 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*. *Aquaculture Research*, 27, 121-133.
- Rye, M., Gjerde, B., Gjedrem, T., 2010. Genetic development programs for aquaculture species in developed countries. 9th World Congress on Genetics Applied to Livestock production, Leipzig, Germany, August 1–6, p. 8.
- Rye, M., Refstie, T., 1995. Phenotypic and genetic parameters of body size traits in Atlantic salmon. *Aquaculture Research* 26, 875-885.
- 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., Dupont-Nivet, M., Sabourault, M., Haffray, P., Laureau, S., Vidal, M-O., Chatain, B., 2009. Genetic variation for carcass quality traits in cultured sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Aquatic Living Resources*, 22, 105–112.
- Sánchez, J.J., Børsting, C., Hallenberg, C., Buchard, A., Hernández, A., Morling, N., 2003. Multiplex PCR and minisequencing of Snps– a model with 35 Y chromosome Snps. *Forensic Science International*, 137, 74-84
- Sang N.V., Klemetsdal G, Ødegård J., Gjølven H.M., 2012. Genetic parameters of economically important traits recorded at a given age in striped catfish (*Pangasianodon hypophthalmus*). *Aquaculture*, 344–349, 82–89.
- Sang, N.V., Thomassen, M., Klemetsdal, G., Gjølven, H.M., 2009. Modelling of fillet fat, fillet weight and fillet yield on live River Catfish (*Pangasianodon hypophthalmus*). *Aquaculture*, 288, 3–4, 166–171.
- 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.). *Aquaculture Nutrition*, 5, 147-156.
- Sargent, J.R., Bell, J.G., McGhee, J., McEvoy, J., Webster, J.L., 2001. The nutritional value of fish. In: *Farmed Fish Quality* (Kestin, S.C. & Warriss, P.D. eds), pp. 3–12. Fishing News Books, Blackwell Science Ltd, Oxford.
- 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. *Ecology 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.

- Sfakianakis, D.G., Koumoundouros, G., Divanach P., Kentouri, M., 2004. Osteological development of the vertebral column and of the fins in *Pagellus erythrinus* (L. 1758). Temperature effect on the developmental plasticity and morpho-anatomical abnormalities. *Aquaculture*, 232, 407–424.
- Simm, G., 1998. Genetic improvement of cattle and sheep. Ed. Geoff Simm. Ipswich: Farming Press.
- Skaala, O., Hoyheim, B., Glover, K., Dahle, G., 2004. Microsatellite analysis in domesticated and wild Atlantic salmon (*Salmo salar* L.): allelic diversity and identification of individuals. *Aquaculture*, 240, 131-143.
- Sobel E., Papp J.C., Lange K., 2002. Detection and integration of genotyping errors in statistical genetics. *American Journal Human Genetics* 70, 496-508.
- Stien, L. H., Manne, F., Ruohonen, K., Kause, A., Kiessling, A., 2006. Automated image analysis as a tool to quantify the colour and composition of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* W.) cutlets. *Aquaculture*, 261, 695-705.
- 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). *Molecular Ecology*, 9(7), 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. *Aquaculture International*, 13, 315-325.
- Taberlet P., Griffin S., Goossens B., 1996. Reliable genotyping of samples with very low DNA quantities using PCR. *Nucleic Acids Research* 24, 3189-3194.
- 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. *Fisheries Science*, 63 (2), 199-204.
- Tave, D., Handwerker, T.S., 1994. Semi-operculum: A non-heritable birth defect in *Tilapia nilotica*. *Journal of the World Aquaculture. Soc.* 25, 333–336.
- Thankappan, C., Thampy, D.M., 1990. Cases of deformities in some cultivable fishes. *Indian Journal Fish*, 37 (2), 171-173.
- Thorland I., Papaioannou, N., Kottaras, L., Refstie, T., Pappasolomontos, S., Rye, M., 2006. Family based selection for production traits in gilthead seabream (*Sparus aurata*) and European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) in Greece. *Genetics in Aquaculture IX*, p104 (presentación oral). Montpellier, France.
- Timmermans, A. J. M., 1998. Computer vision system for online sorting of pot plants based on learning techniques. *Acta Horticulturae*, 421, 91–98.
- Toro, M.A., López-Fanjul C., 2009. Diseños de programas de mejora genética en acuicultura. En: *Genética y genómica en acuicultura*. Coord., Martínez, P., Figueras, A. Ed. Publicaciones Científicas y Tecnológicas de la Fundación Observatorio Español de Acuicultura, Madrid, p. 183-212. ISBN, 978-84-00-085537, 527 pp.
- Trocino, A. Xiccato, G., Majolini, D., Tazzoli, M., Bertotto, D., Pascoli, F., Palazzi, R., 2012. Assessing the quality of organic and conventionally-farmed European sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Food Chemistry*, 131, 427–433.
- Tryggvadottir, S.V., Olafsdottir, G., 2000. Multisensor for fish. Questionnaire on quality attributes and control methods. Texture and electronic nose to evaluate fish freshness. Project Report FAIR CT-98-4076, Reykjavik, Iceland.
- Van de Goor, L.H.P., Panneman, H., Van Haeringen, W.A., 2009a. A proposal for standardization in forensic bovine DNA typing: allele nomenclature of 16 cattle-specific short tandem repeat loci. *Animal Genetics* 40, 630-636.

- Van de Goor, L.H.P., Panneman, H., Van Haeringen, W.A., 2009b. A proposal for standardization in forensic equine DNA typing: allele nomenclature for 17 equine-specific STR loci. *Animal Genetics* 41, 122-127.
- Vandeputte, M., Mauger, S., Dupont-Nivet, M., 2006. An evaluation of allowing for mismatches as a way to manage genotyping errors in parentage assignment by exclusion. *Molecular Ecology Notes*, 6, 265–267.
- Vandeputte, M., Rossignol, M.N., Pincet, C., 2011. From theory to practice: Empirical evaluation of the assignment power of marker sets for pedigree analysis in fish breeding. *Aquaculture* 314, 80-86.
- Verhaegen, Y., Adriaens D., De Wolf, T., Dhert, P., Sorgeloos., P. 2007. Deformities in larval gilthead sea bream (*Sparus aurata*): A qualitative and quantitative analysis using geometric morphometrics. *Aquaculture*, 268, 156–168.
- 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. *Animal Genetics* 33, 33-41.
- Vogiatzi, E., Lagnel, J., Pakaki, V., Louro, B., Canario, A.V.M., Reinhardt, R., Kotoulas, G., Magoulas, A., Tsigenopoulos, C.S., 2011. In silico mining and characterization of simple sequence repeats from gilthead sea bream (*Sparus aurata*) expressed sequence tags (EST-SSRs); PCR amplification, polymorphism evaluation and multiplexing and cross-species assays. *Marine Genomics* 4, 83-91.
- Volckaert, F.A.M., Hellemans, B., Batargias, C., Louro, B., Massault, C., Van Houdt, J.K.J., Haley, C., De Koning, D.J., Canario, A.V.M., 2012. Heritability of cortisol response to confinement stress in European sea bass *Dicentrarchus labrax*. *Genetics Selection Evolution*, 44, 15.
- Waldbieser, G., Wolters, W., 1999. Application of polymorphic microsatellite loci in a Channel catfish *Ictalurus punctatus* breeding program. *Journal of the World Aquaculture Society*, 30, 256-262.
- Weeks, D. E., Conley, Y. P., Ferrell, R. E., Mah, T. S., Gorin, M. B., 2002. A tale of two genotypes: consistency between two high-throughput genotyping centers. *Genome Research* 12, 430-435.
- Weeranantanaphan, J., Downey, G., Allen, P., Sun, D-W., 2011. A review of near infrared spectroscopy in muscle food analysis: 2005-2010. *Journal of Near Infrared Spectroscopy*, 19, 61-104.
- Whitehead, C.C., Fleming, R.H., Julian, R.J., Sorensen, P., 2003. Skeletal problems associated with selection for increased production. In: Muir, W.M. (Ed.), *Poultry Genetics, Breeding and Biotechnology*. CABI Publishing, Oxon, pp. 29–52.
- Wilson A.J., Ferguson, M.M., 2002. Molecular pedigree analysis in natural populations of fishes: approaches, applications, and practical considerations. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 59, 1696-1707.
- Winkelman, A.M., Peterson, R.G., 1994. Heritabilities, dominance variation, common environmental effects and genotype by environment interactions for weight and length in chinook salmon. *Aquaculture*, 125, 17-30.
- Witten, P. E., Gil-Martens, L., Huysseune, A., Takle, H., Hjelde, K., 2009. Towards a classification and an understanding of developmental relationships of vertebral body malformations in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Aquaculture*, 295, 6–14.

- 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. *Nucleic acids research*, 30, 23, 131.
- Zamil, M., Rawdah, T., Attar, K., Arab, M., 1992. Mineral and proximate composition of some commercially important fish of the Arabian Gulf. *Food chemistry*, 45, 95-8.
- 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. *Annales de Biologie Animale, Biochimie, Biophysique*, 18, 4, 877-882.

6. ANEXO

Artículo Lee-Montero *et al.* (*en prensa*)

Animal Genetics - Decision on Manuscript ID AnGen-12-08-0193

james.kijas@csiro.au <james.kijas@csiro.au>

3 de octubre de 2012
02:47

Para: jafonso@dpat.ulpgc.es, anadeagaete@gmail.com
Cc: james.kijas@csiro.au

02-Oct-2012

Dear Dr. Afonso:

Manuscript ID AnGen-12-08-0193 entitled "Development of the first standardized panel of two new microsatellites multiplex PCRs for gilthead seabream (*Sparus aurata* L.)" has been reviewed. The comments of the reviewers are included at the bottom of this letter. Based on the reviewers recommendations, I am pleased to accept your paper for publication in Animal Genetics. However, revisions are needed before I can send the paper to the publisher.

Please amend the manuscript in accordance with the reviewer's and my comments or provide details on why you did not accept these suggestions. Because we are trying to facilitate timely publication of manuscripts in Animal Genetics, your revision should be submitted as soon as possible. If you do not submit your revision within 3 months, I will consider your paper as a new submission.

I look forward to receiving your revision.

Sincerely,
Dr. James Kijas
Editor, Animal Genetics
james.kijas@csiro.au



**Development of the first standardized panel of two new
microsatellites multiplex PCRs for gilthead seabream
(*Sparus aurata* L.)**

Journal:	<i>Animal Genetics</i>
Manuscript ID:	Draft
Manuscript Type:	Full Paper
Date Submitted by the Author:	n/a
Complete List of Authors:	Lee, Ivonne; Universidad Santo Tomás, Acuicultura Navarro, Ana; Universidad de Las Palmas de Gran Canaria, Patología animal, producción animal, bromatología y tecnología de los alimentos Borrell Pichs, Yaisel; Universidad de Oviedo, Biología Funcional García-Celdrán, Marta; Universidad Politécnica de Cartagena, Ciencia y Tecnología Agraria Martín, Nuria; Centro de Investigación y Formación Pesquera y Acuícola El Toruño, Laboratorio de Biología Molecular Negrín-Báez, Davinia; Universidad de Las Palmas de Gran Canaria, Instituto Universitario de Sanidad Animal y Seguridad Alimentaria Sánchez Prado, Jose; Universidad de Oviedo, Biología Funcional Armero, Eva; Universidad Politécnica de Cartagena, Ciencia y Tecnología Agraria Zamorano, María; Universidad de Las Palmas de Gran Canaria, Patología animal, producción animal, bromatología y tecnología de los alimentos Afonso, Juan; universidad de Las Palmas de Gran Canaria, Patología animal, producción animal, bromatología y tecnología de los alimentos
Keywords:	Gilthead seabream, <i>Sparus aurata</i> , Microsatellite, Multiplex PCR, International panel

SCHOLARONE™
Manuscripts

Development of the first standardized panel of two new microsatellites multiplex PCRs for gilthead seabream (*Sparus aurata* L.)

I. Lee^{1,2}, A. Navarro¹, Y. Borrell³, M. García-Celdran⁴, N. Martín⁵, D. Negrín-Báez¹, J.A. Sánchez³, E. Armero⁴, C. Berbel⁵, M.J. Zamorano¹, J. Sánchez⁶, A. Estévez⁷, G. Ramis⁸, M. Manchado⁵, J.M. Afonso¹

¹ Universidad de Las Palmas de Gran Canaria (ULPGC). Instituto Universitario de Sanidad Animal y Seguridad Alimentaria (IUSA). Instituto Canario de Ciencias Marinas (ICCM). Grupo de Investigación en Acuicultura (GIA). Carretera Trasmontaña s/n, 35413, Arucas, Las Palmas. Spain. ² Universidad Santo Tomás, Buena Vecindad 91, Puerto Montt, Chile. ³ Universidad de Oviedo. Calle Principado, 3, 33003, Oviedo, Spain. ⁴ Universidad Politécnica de Cartagena. Plaza del Cronista Valverde, Edificio "La Milagrosa" 30202, Cartagena, Spain. ⁵ Centro de Investigación y Formación Pesquera y Acuícola El Toruño (IFAPA). Ctra. 5 Km. 654a. Camino de Tiro Pichón, 11500, Puerto de Santa María, Cádiz, Spain. ⁶ Instituto Nacional de Toxicología y Ciencias Forenses (INT). La Cuesta 38320, La Laguna, Sta. Cruz de Tenerife, Spain. ⁷ Institut de Recerca i Tecnologia Agroalimentàries (IRTA). Centro de Acuicultura. Ctra. Poble Nou Km 6, 43540, San Carlos de la Rápita, Tarragona. Spain. ⁸ Universidad de Murcia. Campus de Espinardo, 30100. Instituto Murciano de Investigación y Desarrollo Agrario y Alimentario (IMIDA), C/ Mayor S/N, 30150, Murcia, Spain.

CORRESPONDING AUTHOR: J.M. Afonso (Phone: +34 928 459734; Fax: +34 928 451142; E-mail: jafonso@dpat.ulpgc.es)

Summary

The high number of multiplex PCRs developed for gilthead seabream (*Sparus aurata* L.) from many different microsatellite markers does not allow comparison among populations. This highlights the need of developing a reproducible panel of markers which can be used with safety and reliability by all users. In this study the first standardized panel of two new microsatellites multiplex PCRs was developed for this species. Primers of 138 specific microsatellites from the genetic linkage map were redesigned and evaluated according to their genetic variability, allele size range and genotyping reliability. A protocol to identify and classify genotyping errors or potential errors was proposed to assess the reliability of each marker. Two new multiplex PCRs from the best assed markers were designed with 11 markers in each, named SMsa1 and SMsa2 (*SuperMultiplex Sparus aurata*). Three broodstocks (59, 47 and 98 breeders) from different Spanish companies and a sample of 80 offspring from each one, were analysed to validate the usefulness of these multiplexes in the parental assignation. It was possible to assign each offspring to a single parent pair (100% success) using the exclusion method with SMsa1 or/and SMsa2. In each genotyped a reference sample (Ref-sa) was used and its DNA is available on request like the

1
2
3 kits of bin set to genotype by the *GeneMapper* (v.3.7) software (kit-SMsa1 and kit-SMsa2). This
4
5 will be a robust and effective tool for pedigree analysis or characterization of populations and will
6
7 be proposed as an international panel for this species.
8
9

10
11 **Keywords:** Gilthead seabream; *Sparus aurata*; Microsatellite; Multiplex PCR; International
12
13 panel.
14
15

16 17 18 **Introduction**

19
20
21 Gilthead seabream (*Sparus aurata* L.) is one of the most important and consolidated species in
22
23 Mediterranean aquaculture, with a production of 151.346 metric tons (MT) in 2011. Spain is the
24
25 third largest producer of gilthead seabream with 16.930 MT which represents up to 11.2% of the
26
27 total worldwide production (APROMAR, 2012).
28
29

30
31 As consequence of the growth and consolidation of the gilthead seabream industry, companies
32
33 demand further improvement in the production cycles to reduce costs whereas preserving quality.
34
35 For this purpose, implementation of genetic selection programs is a priority. Gilthead seabream
36
37 production is mainly carried out by mass-spawning. This prevents to know the fish genealogy
38
39 (breeders and descendents) which is imperative to estimate genetic parameters. The
40
41 implementation of breeding programmes in this kind of industrial production system (Navarro *et*
42
43 *al.*, 2009a) needs both physical tagging (Navarro *et al.*, 2006) and genetic identification of parent–
44
45 offspring relationships by analysing molecular markers (Navarro *et al.*, 2008), in order to avoid
46
47 expensive genetic analysis in all sampling points during on-growing process (Navarro *et al.*,
48
49 2009b). Thus, to promote genetic selection schemes in industry is very important to dispose of a
50
51 standardized system to assign correctly familial relationships. The number of *loci* needed for an
52
53 efficient assignment depends on parameters such as, population size and allelic diversity
54
55 (Bernatchez & Duchesne, 2000; Villanueva *et al.*, 2002), the number of breeders contributing to
56
57
58
59
60

1
2
3 spawning (Blouin *et al.*, 1996; Liu & Cordes, 2004), the level of homozygosity (Marshall *et al.*,
4
5 1998), or the existence of null alleles (Borrell *et al.*, 2004; Castro *et al.*, 2007; Navarro *et al.*,
6
7 2008). Using a high number of microsatellite markers ensures an efficient relationship assignment
8
9 in any situation (Navarro *et al.*, 2008) which, combined in a multiplex PCR reaction greatly
10
11 reduces costs. Multiplex PCR also reduces time and associated errors and it is a powerful
12
13 technique that can increase the productivity of genetic studies (Neff & Gross, 2000). However,
14
15 genotyping methods always have associated risks for errors which must be taken into account in
16
17 the reliability of the results (Taberlet *et al.*, 1996; Borrell *et al.*, 2004; Hoffman & Amos, 2005;
18
19 Castro *et al.*, 2006). Genotyping errors result from diverse and complex origins, such as, errors
20
21 linked to the DNA sequence, errors due to the low quality or quantity of the DNA (Borrell *et al.*,
22
23 2011), and human factors (Hoffman & Amos, 2005; Pompanon *et al.*, 2005). Genotyping errors
24
25 due to human mistakes are minimized by multiplex assays, since they reduce steps during the
26
27 sample analysis process and introduce automation (Bonin *et al.*, 2004). Identify and reduce
28
29 genotyping errors inherent to each microsatellite (Castro *et al.*, 2004; Hoffman & Amos, 2005;
30
31 Pompanon *et al.*, 2005; Castro *et al.*, 2006) is also very important, especially for inter-laboratory
32
33 reproducibility (Sobel *et al.*, 2002; Weeks *et al.*, 2002).
34
35
36
37

38 The first multiplex PCRs developed for gilthead seabream were by Launey *et al.* (2003) and
39
40 Brown *et al.* (2005). These authors isolated new specific microsatellites and proposed two (three
41
42 and five dinucleotide markers) and one (four dinucleotide markers) multiplex reactions,
43
44 respectively. Navarro *et al.* (2008) developed two robust interspecific multiplex reactions, RimA
45
46 of ten and RimB of seven redesigned microsatellite markers, achieving 100% of success in
47
48 parental assignments despite the presence of null alleles. Porta *et al.* (2010) proposed two specific
49
50 multiplex reactions of four (SaGT4) and six (SaGT6) dinucleotide microsatellite markers to
51
52 successfully assign paternity to 95% of the studied offspring. Borrell *et al.* (2011) developed a
53
54 multiplex PCR (OVIDORPLEX) of nine microsatellite markers (four of which were interspecific)
55
56
57
58
59
60

1
2
3 that successfully assigned 99.2 %. Vogiatzi *et al.* (2011) screened for microsatellite sequences
4
5 found in coding regions derived from an EST-database of gilthead seabream. They evaluated 63
6
7 di-, tri-, tetra-, penta- and hexanucleotide microsatellites for polymorphisms and variations in
8
9 length. Moreover, these authors proposed combining markers that require identical annealing
10
11 temperatures to create five multiplex PCRs, whose number of markers ranged from four to nine in
12
13 each assay. These reactions were tested on only four wild individuals.
14
15

16 This high number of multiplex PCRs developed for gilthead seabream from many different
17
18 microsatellite markers does not allow comparison among populations and data from companies
19
20 and research groups. This highlights the need of developing a standardized panel of markers
21
22 which could be used with safety and reliability by all users. An international panel is a set of
23
24 highly polymorphic, specific and reproducible markers recommended by the International Society
25
26 for Animal Genetics (ISAG). The set of markers must be previously assessed according to their
27
28 polymorphism and their genotyping errors by an ISAG Comparison Test (CT) in which several
29
30 markers are shared among laboratories to be amplified using the same samples and to have
31
32 international agreement on nomenclature and procedures. The results are discussed at a conference
33
34 of the ISAG and a summary with the international panel is established by the Standing Committee
35
36 and reported to the Society. International panels of markers for land species where genetic
37
38 improvement is well-established are becoming more common. However, in fish no international
39
40 panels of markers have been published yet.
41
42
43

44 The main objective of this study was to develop multiplex PCRs, from a wide spectrum of specific
45
46 microsatellite markers, which may be proposed to the International Association for Genetics in
47
48 Aquaculture (IAGA) as an international panel of markers for gilthead seabream, by following
49
50 these steps: a) to redesign primers of 138 microsatellite markers from gilthead seabream genetic
51
52 linkage map in such a way as to be amplified using the same PCR conditions, b) to evaluate these
53
54 markers according to their genetic variability, allele size range and genotyping reliability, c) to
55
56
57
58
59
60

1
2
3 propose a protocol to identify and classify potential errors as a method to assess the reliability of
4 each marker, d) to develop two multiplex PCRs with eleven markers in each one as an
5 international panel of markers for gilthead seabream, using the best microsatellites, e) to validate
6 the robustness of these multiplex PCRs by amplifying the same samples in four different
7 laboratories and f) to check their effectiveness in parentage assignment in a sample of offspring
8 from an industrial mass-spawning.
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18

19 **Materials and methods**

20 **Samples**

21
22 A total of three gilthead seabream broodstocks and 256 of their offspring belonging to a selection
23 breeding program (PROGENSA[®], 2009) were analysed.
24
25

26 From this 256 fish, six descendents from the Instituto Canario de Ciencias Marinas (ICCM,
27 Canarias, Spain), five from PISCIMAR S.L. (PMAR, Cataluña, Spain) and five from
28 CULMASUR S.A (CSUR, Andalucía, Spain) were used as Control samples to study the genetic
29 variability and reliability of all the microsatellite markers. From these samples, four individuals
30 were also used to optimize the multiplex PCR reactions (Testing samples). Three broodstocks (59
31 breeders of ICCM, 47 of PMAR and 98 of CSUR) and a sample of 80 offspring from each one
32 were analysed to validate the usefulness of these multiplexes in the parental assignment.
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42

43 DNA was extracted from fin tissue previously preserved in absolute ethanol at room temperature,
44 using the *DNAeasy kit* (QUIAGEN[®]), and then kept at 4°C following the manufacturer's
45 recommendations. DNA quality and quantity were determined using a *Nanodrop 1000*
46 *spectrophotometer v.3.7* (Thermo Fisher Scientific, Wilmington, U.S.A.). DNA integrity was
47 checked by means of electrophoresis in a 1% agarose gel (8 v·cm⁻¹) by ethidium bromide staining
48 (0.5 µg·µl⁻¹) and analysed with *Quantity One*© *Software* (Bio-Rad Laboratories, Hemel
49 Hempstead Hertfordshire, UK), using Lambda Hind-III as molecular weight marker.
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

Microsatellite evaluation

Primers design:

From all published microsatellites in the genetic map of gilthead seabream (Franch *et al.*, 2006; Senger *et al.*, 2006), 138 primer pairs were designed to amplify markers using the same PCR conditions. The chosen amplicon length ranged from 70 to 200 base pairs (bp) to optimize effectiveness of the multiplex reaction (Dakin & Avise, 2004). Also, the existence of flanking DNA sequences free from interfering polymorphisms, such as nucleotide substitutions in potential primer binding sites, was considered. Sequences with high complexity were avoided during primer design to ensure sensitivity and specificity of the multiplex assay. The aim was to obtain a theoretical melting temperature of $60^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ at a salt concentration (K^+ , Na^+ , Tris^+ or NH_4^+) of 180 mM. GC content was comprised between 35–60% to avoid palindromes or homopolymers such as poly (dT) longer than five bases. All primer candidates were analysed for hairpin or secondary structures using the software found on-line at Integrated DNA Technologies (<http://www.idtdna.com/Scitools/Applications/mFold/>). Stable secondary structures for primer sequences around each microsatellite region were avoided (below the $-13 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$ threshold of free energy) (Yuryev *et al.*, 2002). Primer characteristics were selected to ensure equal PCR amplification efficiency for all DNA fragments as previously described (Sánchez *et al.*, 2003). Primers were renamed with an internal code in order to facilitate understanding of this work.

PCR reaction:

Each microsatellite marker was tested in a single PCR using the Control samples in order to confirm its correct amplification, allele size range, morphology, genetic variability and reliability of genotyping. The PCR conditions consisted of an initial denaturation at 95°C for 10 min, followed by 28 cycles of 94°C for 30 s, 60°C for 1 min and 65°C for 1 min, with a final extension of 60°C for 60 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)

1
2
3 (Applied Biosystem[®], USA), 3 mM MgCl₂, 0.2 mM of each dNTP, 0.04 units μl⁻¹ *AmpliTaq Gold*
4 *DNA polymerase* (Applied Biosystem[®]), 2.4-6.4 ng·μl⁻¹ of DNA template, and 0.2 μM of each
5
6
7 primer. Before running PCR fragments in the automatic sequencer, an aliquot was checked on 2%
8
9 agarose gel for 30 min (8v·cm⁻¹), to test the adequate amplification of multiplex amplicons.

10
11 Later, 1 μl of each reaction product (diluted at 75% with Milli-Q water) was mixed with 9.75 μl of
12
13 Hi-Di formamide and 0.25 μl of *GeneScan LIZ 500* (Applied Biosystem[®], USA) molecular weight
14
15 marker, and loaded in an *ABI Prism[®] 3130XL automatic sequencer* (Applied Biosystem[®], USA) of
16
17 16 capillaries using POP-7 polymer and run conditions of 60°C, 3000 v, 1500 s. The reaction
18
19 products of each single PCR assay were initially loaded in groups of three markers taking into
20
21 account their fluorochromes, allelic ranges and the intensity of the band on agarose gel.
22
23

24
25 Electropherograms were analysed using the *GeneMapper* (v.3.7) software (Applied Biosystem[®],
26
27 USA).

28
29 Genotyping reliability:

30
31 Genotyping reliability of each microsatellite was evaluated by determining the error or potential
32
33 error rates in the Control samples. A scale assigning a score from 1 to 3 for each microsatellite
34
35 was established: 1 denoted ambiguous genotypes in more than 30% of the samples, 2 ambiguous
36
37 genotypes in 30% or less of the samples and 3 unambiguous genotypes in 100% of the samples.

38
39 Four error types were considered: according to peak scoring; a) *inadequate amplification*: peak
40
41 heights less than 300 Relative Fluorescent Units (RFU), with high background or variable allelic
42
43 morphology (Fig 1A; Pompanon *et al.*, 2005), b) *long allele dropout*: preferential amplification of
44
45 the shorter allele (Fig 1B; Castro *et al.*, 2006); c) *unclear banding pattern*: high stutter bands that
46
47 make it difficult to distinguish between a homozygote and a heterozygote for adjacent alleles (Fig
48
49 1C; Hoffman & Amos, 2005), and according to allele calling, d) *intermediate alleles*: dinucleotide
50
51 *loci* with alleles that differ from each other by 1 bp (Fig 1D; Castro *et al.*, 2004).
52
53
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3 Previously, the right running of the molecular weight markers were checked in all the
4
5 electropherograms, in order to consider only the errors linked to the DNA sequence primers.
6

7 **SuperMultiplex PCRs optimization**

8
9 After microsatellite evaluation, those microsatellite markers without amplification, bad reliability
10
11 or very low genetic variability were discarded, remaining 79 optimal markers, named adequate
12
13 microsatellites. Their sequences, *loci* accession number in GenBank and fluorochromes of each
14
15 microsatellite marker are shown in Table 1. From these markers, two SuperMultiplex PCRs were
16
17 designed and named SMsa1 and SMsa2 (*SuperMultiplex Sparus aurata*). The number of markers
18
19 included in each multiplex PCR was as high as possible taking into account their linkage group (in
20
21 order not to repeat any in each reaction), allele size range and assigned labelling fluorochrome (the
22
23 minimum distance between markers with the same colour was 18 bp to avoid overlapping in
24
25 future or unknown samples). Initially, 0.2 μM of each primer was used for each multiplex PCR
26
27 and primer concentrations were modified subsequently to obtain peak heights between 600 and
28
29 3000 RFU for each microsatellite marker as described Navarro *et al.* (2008). Those microsatellite
30
31 markers that failed amplification were replaced by new ones. Each set-up was tested on Testing
32
33 samples. The PCR conditions were the same as those used in the initial single PCR. Again, an
34
35 aliquot was checked on 2% agarose gel for 30 min ($8\text{v}\cdot\text{cm}^{-1}$), to test the adequate amplification of
36
37 the multiplex amplicons. The automatic sequencer conditions were also the same as those used in
38
39 the single PCR except that the reaction product was diluted at 50-85% depending on each machine
40
41 (i.e. each laboratory). Electropherograms were analysed using the *GeneMapper* (v.3.7) software
42
43 and a kit of bin set were created for each multiplex (kit-SMsa1 and kit-SMsa2, available on
44
45 request to jafonso@dpat.ulpgc.es).
46
47
48
49
50

51 **Genotyping and familial assignments**

52
53 The Control samples were amplified with SMsa1 and SMsa2 in four Spanish genetics laboratories
54
55 for aquaculture and analysed using the same kit of bin set in order to validate their robustness in
56
57
58
59
60

1
2
3 the genotyping. To test their usefulness in the parental assignment the three broodstocks and their
4
5 offspring were genotyped with SMSa1 and only the ICCM broodstock and their descendents with
6
7 SMSa2. Each broodstock was genotyped in a different Spanish genetics laboratory using the kit-
8
9 SMSa1 of bin set for the *GeneMapper* (In each genotyped one of the Control samples was used as
10
11 a reference sample (Ref-sa) (DNA available on request to jafonso@dpat.ulpgc.es). Familial
12
13 assignments were determined using the genotypes of each multiplex PCR.
14
15

16 **Analysis data**

17
18 The observed heterozygosity (H_o), expected heterozygosity (H_e), the Polymorphic Information
19
20 Content (PIC) of each marker was estimated using *Cervus* (v 3.0.3) (Kalinowski *et al.*, 2007).
21
22 Markers were sorted according to their PIC value, as highly informative ($PIC \geq 0.5$), reasonably
23
24 informative ($0.5 > PIC > 0.25$) and slightly informative ($PIC \leq 0.25$) (Botstein *et al.*, 1980). The real
25
26 frequency of null alleles was calculated from the breeders contributing to the spawning, by
27
28 analysis of the segregation. Of each multiplex PCR the Combined Exclusion Probability (CEP) for
29
30 the parent pair option (Jamieson & Taylor, 1997) was estimated by *Cervus* (v 3.0.3) (Kalinowski
31
32 *et al.*, 2007). The Predicted Assignment Rate (Pall), a parameter to evaluate assignment power of
33
34 microsatellites markers for pedigree analysis in fish breeding, proposed by Vandeputte *et al.*
35
36 (2011) was estimated using the equation number nine.
37
38 Parental assignments between breeders (with unknown gender) and their descendents were
39
40 determined using the exclusion method by *VITASSING* V.8_2.1 software (Vandeputte *et al.*,
41
42 2006).
43
44
45
46
47
48

49 **Results**

50 **Microsatellite evaluation**

51
52 Out of the 138 microsatellite markers, 10 (A3, B9, B11, C5, D8, E7, H3, J4, J12, K12) did not
53
54 work individually and two were monomorphic (D3, M1).
55
56
57
58
59
60

1
2
3 In the remaining 126 markers, H_o ranged from 0.08 to 1, and H_e ranged from 0.121 to 0.976.
4
5 Those markers that showed a $H_o < 0.3$ were considered inadequate (A2, A6, A7, B2, B5, C8, C11,
6
7 I1, J6, J7, L4, L6, M8). According to their PIC value, 77% of the markers were highly
8
9 informative, 19.8% were reasonably informative (A1, A2, A4, A7, A10, B5, B7, B10, C6, C11,
10
11 D5, E2, E10, I1, J6, K1, K5, L1, L5, L6, L7, L8, L9, L10, L12) and 3.2% were slightly
12
13 informative (B2, C8, J7, L4). Only highly informative markers were considered adequate.

14
15
16 Errors or potential errors were found in 20 of the 126 markers which were scored with 1 or 2: five
17
18 markers showed *inadequate amplification* (B10, D1, G8, J6, L3), six showed *long allele drop outs*
19
20 (B4, G1, I3, J5, K1, K11), two had *unclear banding patterns* (D7, F8) and seven showed
21
22 intermediate allele in allele calling (C7, H9, K5, K9, K10, L2, M2). Only the 3-scored markers
23
24 were considered as adequate.

25
26
27 At the end of screening, 79 microsatellites were selected as adequate, whose genetic variability
28
29 and allele size range are shown in Fig 2. The mean values of these markers were 8.2 for number of
30
31 alleles (from 3 to 21), 0.762 for H_o (from 0.364 to 1.000), 0.797 for H_e (0.589 to 0.976) and 0.737
32
33 for PIC. All these markers were dinucleotides except five that were tetranucleotides (B6, F1, F3,
34
35 I9, M5).

36 37 38 **SuperMultiplex PCRs optimization**

39
40 From the 79 microsatellites selected as adequate markers, two multiplex PCRs of 11 markers each
41
42 were designed. Out of the microsatellites chosen initially for each multiplex reaction, the A9 in the
43
44 SMsa1 and the G4 in the SMsa2 did not work properly. The A9 was replaced by the F6. There
45
46 was not any adequate marker that could replace the G4 taking into account its linkage group, allele
47
48 size range and fluorochrome. Therefore a reasonably informative marker was included as a
49
50 replacement (L7) which at least satisfied the other requirements. The final primer sets of each
51
52 multiplex PCR, and their concentrations, archived after nine genotyping runs, are reported in
53
54 Table 2.
55
56
57
58
59
60

Genotyping and familial assignments

The genotype of Ref-sa for each marker in SMsa1 and SMsa2 is shown in Table 2.

The genetic diversity for each microsatellite marker of both multiplexes is shown in Table 2.

These data were estimated for SMsa1 in all breeders of the three broodstocks and for SMsa2 in the ICCM broodstock, 25 descendents from PMAR and 25 descendents from CSUR. The mean values were: number of alleles (NA)=11.6, $H_o=0.737$, $H_e=0.755$ and $PIC=0.725$ for SMsa1, and NA=10.4, $H_o=0.760$, $H_e=0.786$ and $PIC=0.752$ for SMsa2 (without L7). *A priori*, CEPs were maximum (0.999) for both multiplexes, while Palls were 0.899 for SMsa1 and 0.878 for SMsa2. The amplicon length for *loci* of both multiplexes ranged from 64 to 232 bp, although only three markers were higher than 180 bp. The minimum distance between markers with the same colour after genotyping was 5 bp in the SMsa1 and 11 bp in the SMsa2. Genetic variability of SMsa1 for each broodstock was similar. The mean values were $H_o=0.765$, $H_e=0.758$, $PIC=0.722$ for the ICCM; $H_o=0.733$, $H_e=0.754$, $PIC=0.715$ for the PMAR; and $H_o=0.723$, $H_e=0.738$, $PIC=0.704$ for the CSUR.

The genotyping reliability of each multiplex PCR was checked after genotyping the Control samples by the four laboratories. The error percentage, i.e. the percentage of differences in allelic scores among laboratories, was 1% in SMsa1 and 0.5% in SMsa2.

Parental assignments were determined allowing three errors. The largest numbers of errors were identified as null alleles. In SMsa1, presence of null alleles and their frequencies were different according to broodstock. The ICCM breeders showed null alleles in the markers D4 (0.136) and A5 (0.023), those of PMAR in the markers D4 (0.611) and C3 (0.833) and those of CSUR in the markers D4 (0,037). In SMsa2, only in the ICCM breeders, the markers M3 (0.045) and G3 (0.028) showed null alleles.

The real parental assignment rates with SMsa1 were very successful in all broodstocks. In offspring from ICCM and PMAR a 100% of successful was achieved. Initially, 2.5% of offspring

1
2
3 from ICCM was assigned to two possible parent pairs, but after inferring the gender of the
4
5 breeders from the assigned pairs, two of these pairs resulted incompatible. 88% of offspring from
6
7 CSUR was assigned to a single parent pair and 12% to two possible pairs with a common breeder.
8
9 The parental assignment using SMsa2 was only carried out in offspring from ICCM and 100% of
10
11 success was achieved.
12
13
14
15

16 Discussion

17 Microsatellite evaluation

18
19
20 Microsatellites have provided geneticists with very powerful tools which have opened exciting
21
22 perspectives in their application to many research fields and applications to aquaculture in
23
24 particular (Lo Presti *et al.*, 2009). They have a high sensitivity for detecting genetic variability
25
26 within and between populations. However they must be tested to know their informativeness
27
28 (Wilson & Ferguson, 2002). In this study, 138 microsatellite markers have been redesigned and
29
30 evaluated according to their genetic variability in three different populations of gilthead seabream.
31
32 At large-scale parentage analyses, H_o and H_e are useful measures of *locus* informativeness (Nei,
33
34 1987). Blouin *et al.* (1996) reported that to estimate relatedness among individuals, almost twice
35
36 the number of *loci* with H_e of 0.62 are required to achieve the same accuracy as a given number of
37
38 microsatellites with H_e of 0.75. Microsatellites also report information about the genetic status of
39
40 the population. In populations of cultured gilthead seabream the mean heterozygosity is high
41
42 (Castro *et al.*, 2007; Navarro *et al.*, 2008; Porta *et al.*, 2010; Borrell *et al.*, 2011), which is closely
43
44 similar to that found in this study. The PIC value is also a measure of informativeness (Botstein *et*
45
46 *al.*, 1980; Hearne *et al.*, 1992) and is commonly used in linkage mapping and really useful to
47
48 conduct parentage analyses (Piñera *et al.*, 2006). In this study, 77% of the markers were highly
49
50 informative. Moreover, in the genetic map no PIC value has been cited for any microsatellite
51
52 (Franch *et al.*, 2006; Senger *et al.*, 2006).
53
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3 In the evaluation of microsatellite markers, the genotyping reliability is a critical issue as
4 important as the degree of polymorphism (Miquel *et al.*, 2006). However, most papers do not
5 mention an error rate value which raises doubt as to the reliability of some of their genotypes
6 (Bonin *et al.*, 2004). During the genotype scoring of the electropherogram, difficulties arise that
7 could potentially become genotyping errors (Pompanon *et al.*, 2005) and influence parentage
8 assignments (Bonin *et al.*, 2004). In this study, the genotyping errors or potential errors were
9 classified into four types, according to their peak scoring and to allele calling. The identification
10 of these errors or potential errors is a key for a correct genotype scoring. At the same time, the
11 reliability of each microsatellite genotyping was evaluated by quantification of these errors or
12 potential errors. This method represents a powerful tool for testing the reliability of the genotyping
13 procedure and will allow reliable comparisons among *loci*, studies, or different laboratories. In this
14 study, some kind of errors or potential errors were found in 14 out of the 138 microsatellite
15 markers, i.e. in 18 %, the most frequent error was intermediate alleles (in 7 markers). This is in
16 accordance with the results found by Castro *et al.* (2006) in sole (*Solea senegalensis*). Other
17 microsatellite studies, error rates were around 2 % (Castro *et al.*, 2004; Bonin *et al.*, 2004;
18 Hoffman & Amos, 2005). This difference is due to the fact that any possible source of error has
19 been considered as a potential error, in order to minimize the probability of errors to occur in those
20 microsatellites that were selected as adequate.

21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43 These adequate markers were used to design the supermultiplexes that have been proposed in this
44 study. Additionally, they provide geneticists the possibility to create personalized multiplexes,
45 given that their corresponding primers have been redesigned to be amplified under the same PCR
46 conditions. However, this does not exclude the need for an experimental verification to test the
47 compatibility among primers. The Fig 2 can be used to choose markers which combine according
48 to allele size range.

49 50 51 52 53 54 55 56 **SuperMultiplex PCRs optimization** 57 58 59 60

1
2
3 Multiplex PCR is a key technology for a wide range of applications and low-cost genotyping
4
5 (Henegariu *et al.*, 1997; Rachlin *et al.*, 2005). Once a new multiplex PCR is designed, its
6
7 evaluation and validation is essential (Markoulatus *et al.*, 2002). In this study, two robust 11-
8
9 markers multiplex PCRs (SMsa1 and SMsa2) were evaluated and their effectiveness in parentage
10
11 assignment was tested. The markers were previously evaluated and selected according to their
12
13 informativeness and reliability.
14

15
16 According to Selkoe & Toonen (2006), microsatellites of multiplex PCRs must be informative
17
18 enough to guarantee high quality data. However, highly variable microsatellites (e.g. *loci* with >25
19
20 alleles or 85% heterozygosity) may present complications such as an increase in the frequency of
21
22 genotyping errors (dropout and stutter) and high-mutation rates. The mean number-of-alleles and
23
24 heterozygosity values from the multiplex PCRs in this study were high and similar to those
25
26 reported by other gilthead seabream multiplex PCRs (Launey *et al.*, 2003; Navarro *et al.*, 2008;
27
28 Porta *et al.*, 2010; Vogiatzi *et al.*, 2011), although lower than those described by Borrell *et al.*
29
30 (2011). In addition, the level of polymorphism of the microsatellite markers also depends on the
31
32 characteristics of the population (Vandeputte *et al.*, 2011). The variability found in this-study
33
34 multiplex (evaluated in three geographically-different populations of gilthead seabream)
35
36 accurately may represent the variability of gilthead seabream from aquaculture in Spain.
37
38 Moreover, markers used in this study are non-gene sequences, unlike the multiplex markers used
39
40 by Vogiatzi *et al.* (2011) (EST-SSR). Microsatellites in non-coding regions have a higher
41
42 probability to keep their genetic variability over time, especially when they are used in genetic
43
44 improvement, and selection pressure is applied. On the contrary, selection may decrease
45
46 variability in coding markers during successive generations (Chistiakov *et al.*, 2006).
47
48
49

50
51 When many markers are used in a multiplex, their sizes should be similar to avoid differential
52
53 amplification of size variants due to the competitive nature of multiplex PCR, by which, short-
54
55 length alleles often amplify more efficiently than longer ones (Dakin & Avise, 2004), especially
56
57
58
59
60

1
2
3 when DNA quality is low (Pompanon *et al.*, 2005). In fact, in the multiplex RimA carried out by
4
5 Navarro *et al.* (2008), two microsatellites were lost when degraded DNA was used. In this study,
6
7 amplicon sizes are shorter than those used in other gilthead seabream multiplex studies (Launey *et*
8
9 *al.*, 2003; Navarro *et al.*, 2008; Porta *et al.*, 2010; Borrell *et al.*, 2011; Vogiatzi *et al.*, 2011).

10
11 Another multiplex feature is the space between markers, which is important to avoid that markers
12
13 with the same color overlap (Bonin *et al.*, 2004). In this study, an initial large separation space
14
15 was established. As expected, this was shortened after genotyping, but overlapping was avoided.
16
17 This was remarkable when considering the fact that samples were from three different
18
19 populations.
20
21

22
23 The human forensic community has chosen larger repeat motif microsatellite markers as they have
24
25 a lower probability of error (Perlin *et al.*, 1995; Gagneux *et al.*, 1997; Van de Goor *et al.*, 2009a).

26
27 However, genetic studies on fishes have traditionally used dinucleotide markers, as just a few tri-
28
29 or tetranucleotides have been isolated and, in general, they show a lower variability (Van de Goor
30
31 *et al.*, 2009b). In fact, the new tri-, tetra-, penta- and hexa-nucleotide markers reported by Vogiatzi
32
33 *et al.* (2011) showed a much lower variability than their dinucleotides. This study reports five
34
35 highly informative tetranucleotide markers assessed as adequate, three of which are included in
36
37 the proposed multiplexes. In addition, all dinucleotide markers were optimally redesigned to
38
39 minimize the stutter production and the extra addition of an adenine by the Taq polymerase
40
41 (Sánchez *et al.*, 2003), and their readabilities were subsequently evaluated.
42
43

44
45 The length of the genetic linkage map of gilthead seabream is 1241.9 cM and presents 26 linkage
46
47 groups (LG) (Franch *et al.*, 2006; Senger *et al.*, 2006). QTL searches and Marker-Assisted
48
49 Selection (MAS) are increasingly important tools in genetic selection for animal breeding due to
50
51 the difficulty of doing directly Gene-Assisted-Selection (GAS). For an efficient QTL detection, a
52
53 genetic linkage map with a good level of saturation of molecular markers, adequate phenotypic
54
55 data and an appropriate statistical-genetic model are needed (Lynch & Walsh, 1998). The two
56
57
58
59
60

1
2
3 multiplex reactions developed in this study include 18 linkage groups, which means that 70% of
4
5 LG of the gilthead seabream genetic map is covered, thus making this a powerful and
6
7 complementary tool to search QTLs. Even when considering every published gilthead seabream
8
9 multiplex (Launey *et al.*, 2003; Brown *et al.*, 2005; Navarro *et al.*, 2008; Porta *et al.*, 2010; Borrell
10
11 *et al.*, 2011; Vogiatzi *et al.*, 2011), those reported in this study are the only multiplex reactions
12
13 whose marker's location within the gilthead seabream genetic map are known.
14

15
16 Another application of microsatellite multiplexes is the reconstruction of familial relationships.
17
18 The correct inference of genealogy in genetic programs is critical to estimate genetic parameters
19
20 and to control breeders (Navarro *et al.*, 2009a). In selective breeding, it is extremely important to
21
22 obtain high and reliable assignment rates, as the cost of rearing and phenotyping candidates is high
23
24 and every non assigned fish represents a net loss (Vandeputte *et al.*, 2011). The assignment power
25
26 of a multiplex reaction depends on the number of chosen markers and their level of
27
28 polymorphism. This has been traditionally determined by CEP, an extensively-used theoretical
29
30 parameter, although, according to Navarro *et al.* (2008) and Vandeputte *et al.* (2011), in fish
31
32 breeding this value was overestimated when it was compared with the real assignment rate.
33
34 Vandeputte *et al.* (2011) propose a new parameter: the Predicted Assignment Rate (Pall). In this
35
36 study, both parameters were estimated for the two multiplexes, suggesting that, when the number
37
38 of microsatellite markers is high, the CEP is close to the real value but the predicted assignment
39
40 rate underestimates the real value. On the contrary, when the number of microsatellite markers is
41
42 low, the CEP overestimates the real value and the Pall is more representative of reality. The
43
44 discrimination power of a multiplex may be influenced by the markers location on the genetic
45
46 map. All microsatellites of each multiplex of this study are situated in different linkage groups
47
48 which offer a significant advantage in paternity.
49
50

51
52 Navarro *et al.* (2008) reported that, at least, seven microsatellite markers were required to obtain a
53
54 100% success in paternity inference in a mass-spawning of 60 breeders, under industrial
55
56
57
58
59
60

1
2
3 conditions, although they used ten. Vandeputte *et al.* (2011) also advised to include a few excess
4
5 markers to guarantee the highest assignment rates under all circumstances. In this study, using the
6
7 two proposed 11-marker multiplexes separately for parentage assignment was also successful
8
9 (100% assignment in fish from ICCM and PMAR). The descendants from CSUR (only genotyped
10
11 by SMsa1) did not reach a 100% assignment. That is due to two genetically similar breeders
12
13 (Marshall *et al.*, 1998; Borrell *et al.*, 2002) which had shared genotypes for six of the eleven
14
15 SMsa1 markers and participated in the two possible parent pairs of non-assigned individuals. It is
16
17 noteworthy that this broodstock is very numerous and that this problem is solved using the SMsa2.
18
19 Another possible cause of mismatches between parents and their offspring is the presence of null
20
21 alleles (Marshall *et al.*, 1998). In this study, both multiplexes showed null alleles in the three
22
23 studied populations, even when they were specific markers (although, they had not been tested on
24
25 gilthead seabream). In this study, the marker D4 showed the highest null-allele frequency, which
26
27 is probably due to its large allelic size (Chapuis & Estoup, 2007). Nevertheless, the null-allele
28
29 identification was easily performed and did not affect multiplexes efficacy of parentage
30
31 assignment. When recognized, null alleles were manually recoded as recommended by Navarro *et*
32
33 *al.* (2008), and parental assignments were achieved without errors. In fact, these authors also
34
35 assigned 100% of descendants despite the presence of null alleles, thanks to the incorporation of
36
37 high number of microsatellite markers.
38
39

40
41
42 Another decisive factor in parentage assignment is genotyping error rate (Bonin *et al.*, 2004;
43
44 McKelvey & Schwartz, 2004; Pompanon *et al.*, 2005; Miquel *et al.*, 2006). Error rates (Marshall
45
46 *et al.*, 1998) obtained after both multiplexes genotyping were minimal (1% for SMsa1 and 0.5%
47
48 for SMsa2) given that markers had been previously evaluated. In addition, the error rates
49
50 decreased as more samples were genotyped (data not shown), due to the knowledge of the
51
52 morphology of the peaks. These initial error rates were closely similar to those reported by Borrell
53
54 *et al.* (2011) and lower than those reported by Castro *et al.*, (2004). Moreover, they were obtained
55
56
57
58
59
60

1
2
3 by broodstocks genotyping carried out in different laboratories, which reveals a great
4
5 reproducibility and consistency.
6

7 Standardized genetic tests are important for sharing information, combining datasets and assisting
8
9 with population management. The scientific community provides oversight of industry standards
10
11 pertaining to parentage and identification panels (Lipinski *et al.*, 2007). The International Society
12
13 for Animal Genetics (ISAG) provides the methodology backing this international standardization
14
15 by the Comparison Tests (CT). The aim of this test is to enable laboratories working on
16
17 immunogenetics, DNA and biochemical polymorphisms of animals to maintain high standards, to
18
19 have international agreement on nomenclature and typing procedures and to encourage research.
20
21 This test is developed using DNA samples previously analysed in different laboratories, which
22
23 share the results of verification of individual identification and parentage analysis (ISAG,
24
25 2001/02). In this study, 138 markers have been evaluated and two multiplexes have been validated
26
27 by following these recommendations. So, it has allowed us to propose a reproducible, uniform and
28
29 standardized gilthead seabream panel consisting of 22 microsatellites distributed in two
30
31 multiplexes. These constitute an efficient and robust tool for individual identification, pedigree
32
33 reconstruction and development of methodological tools for genetic improvement, and it will
34
35 support the first gilthead seabream genetic improvement program at Spanish national scale
36
37 (PROGENSA[®], 2009). Also by following ISAG recommendations, this panel can be modified and
38
39 improved by substituting some markers for more adequate ones, changing colors or adding new
40
41 ones (Delghandi *et al.*, 2003).
42
43
44
45
46
47
48

49 **Acknowledgments**

50
51 This study was supported by PROGENSA[®] project (Spanish Ministry of Environment, Rural and
52
53 Marine), the AGL2008-04842/ACU project (Spanish Ministry of Science and Innovation) and a
54
55 grant of the Government of Chile (Beca Presidente de la República-Programa Formación de
56
57
58
59
60

1
2
3 Capital Humano Avanzado) for Ivonne Lee. Special thanks are given to Karl Andree for his
4
5 insightful comments and suggestions on this manuscript.
6
7
8
9

10 11 **References**

12
13
14 APROMAR (2012) Fish marine aquaculture in Spain. (<http://www.apromar.es>).

15
16
17 Argyrokastritis A., Pasparaki A., Kokkinaki M. & Moschonas N.K. (2002) Gilthead sea bream
18
19 (*Sparus aurata* L.) genome survey, unpublished (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)
20
21

22
23 Batargias C., Dermitzakis E., Magoulas A. & Zouros E. (1999) Characterization of six
24
25 polymorphic microsatellite markers in gilthead seabream, *Sparus aurata*. *Molecular Ecology* 8,
26
27 897-898.
28

29
30 Bernatchez L. & Duchesne P. (2000) Individual-based genotype analysis in studies of parentage
31
32 and population assignment: how many loci, how many alleles? *Canadian Journal of Fisheries*
33
34 *and Aquatic Sciences* 57, 1-12.
35

36
37 Blouin M.S., Parsons M., Lacaille V. & Lotz, S. (1996) Use of microsatellite loci to classify
38
39 individuals by relatedness. *Molecular Ecology* 5, 393-401.
40
41

42
43 Bonin A., Bellemain E., Eidesen P.B., Popanon F., Brochmann C. & Taberlet P. (2004) How to
44
45 track and assess genotyping errors in population genetic studies. *Molecular Ecology* 13, 3261-
46
47 3273.
48

49
50 Borrell Y., Álvarez J., Vázquez E., Sánchez Prado J. A., Fernández-Pato C., Martínez-Tapia C. &
51
52 Blanco G. (2002) Aplicación de marcadores microsatélites a los programas de cultivo del
53
54 rodaballo *Scophthalmus maximus* (L., 1758). *Boletín Instituto Español Oceanografía* 18, 203-
55
56 209.
57
58
59
60

- 1
2
3 Borrell Y., Alvarez J., Vazquez E., Fernandez C., Martínez C., Sanchez J.A. & Blanco G. (2004)
4
5 Applying microsatellites to the management of farmed turbot stocks (*Scophthalmus maximus* L.)
6
7 in hatcheries. *Aquaculture* 241, 133-150.
8
9
- 10 Borrell Y.J., Gallego V., García-Fernández C., Mazzeo I., Pérez L., Asturiano J.F., Carleos C.E.,
11
12 Vázquez E., Sánchez J.A. & Blanco G. (2011) Assessment of parental contributions to fast- and
13
14 slow-growing progenies in the sea bream *Sparus aurata* L. using a new multiplex PCR.
15
16 *Aquaculture* 314, 58-65.
17
18
- 19 Botstein D., White R.L., Skolnick M. & Davis R.W. (1980) Construction of a genetic linkage map
20
21 in man using restriction fragment length polymorphisms. *American Journal of Human Genetics*
22
23 32, 314-331.
24
25
- 26 Brown R.C., Tsalavouta M., Terzoglou V., Magoulas A. & McAndrew B.J. (2005) Additional
27
28 microsatellites for *Sparus aurata* and cross-species amplification within the Sparidae family.
29
30 *Molecular Ecology* 5, 605-607.
31
32
- 33 Castro J., Bouza C., Presa P., Pino-Querido A., Riaza A., Ferrerio I., Sanchez L. & Martínez P.
34
35 (2004) Potential sources of error in parentage assessment of turbot (*Scophthalmus maximus*)
36
37 using microsatellite loci. *Aquaculture* 242, 119-135.
38
39
- 40 Castro J., Pino A., Hermida M., Bouza C., Riaza A., Ferreiro I., Sánchez L. & Martínez P. (2006)
41
42 A microsatellite marker tool for parentage assessment in gilthead seabream (*Sparus aurata*).
43
44 *Aquaculture*, 261, 1194-1203.
45
46
- 47 Castro J., Pino A., Hermida M., Bouza C., Chavarriás D., Merino P., Sánchez L. & Martínez P.
48
49 (2007) A microsatellite marker tool for parentage assessment in gilthead seabream (*Sparus*
50
51 *aurata*). In: *Genetics in Aquaculture: Proceedings of the Ninth International Symposium*, 26–30
52
53
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

June 2006, *Aquaculture* 272, Supplement 1 (ed. by M. Vandeputte, B. Chatain & G. Hulata) pp. 210–216. Montpellier, France.

Chapuis M.P. & Estoup A. (2007) Microsatellite null alleles and estimation of population differentiation. *Molecular Biology and Evolution* 24, 621-631.

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.

Dakin E.E. & Avise J.C. (2004) Microsatellite null alleles in parentage analysis. *Heredity* 93, 504-509.

Delghandi M., Mortensen A. & Westgaard J.I. (2003) Simultaneous analysis of six microsatellite markers in Atlantic cod (*Gadus morhua*): a novel multiplex assay system for use in selective breeding studies. *Marine Biotechnology* 5, 141-148.

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.

Gagneux P., Boesch C. & Woodruff D.S. (1997) Microsatellite scoring errors associated with noninvasive genotyping based on nuclear DNA amplified from shed hair. *Molecular Ecology* 6, 861-868.

Hearne C.M., Ghosh S. & Todd J.A. (1992) Microsatellites for linkage analysis of genetic traits. *Trends in Ecology and Evolution* 8, 288-94.

- 1
2
3 Henegariu O., Heerema N.A., Dlouhy S.R., Vance G.H. & Vogt P.H. (1997) Multiplex PCR:
4
5 Critical Parameters and Step-by-Step Protocol. *BioTechniques* 23, 504-511.
6
7
8 Hoffman J.I. & Amos W. (2005) Microsatellite genotyping errors: detection approaches, common
9
10 sources and consequences for parental exclusion. *Molecular Ecology* 14, 599-612.
11
12
13 ISAG (2001/2002) <http://www.isag.us/comptest.asp>, www.isag.org.uk.
14
15
16 Jamieson A. & Taylor S.C.S. (1997) Comparisons of three probability formulae for parentage
17
18 exclusion. *Animal Genetics* 28, 397-400.
19
20
21 Kalinowski S.T., Taper M.L. & Marshall T.C. (2007) Revising how the computer program
22
23 CERVUS accommodates genotyping error increases success in paternity assignment. *Molecular*
24
25 *Ecology* 16, 1099-1106.
26
27
28
29 Launey S., Krieg F., Haffray P., Bruant J.S., Vanniers A. & Guyomard R. (2003) Twelve new
30
31 microsatellite markers for gilthead seabream (*Sparus aurata* L.): characterization, polymorphism
32
33 and linkage. *Molecular Ecology Notes* 3, 457-459.
34
35
36
37 Lipinski M.J., Amigues Y., Blasi M., Broad T.E., Cherbonnel C., Cho G.J., Corley S., Daftari P.,
38
39 Delattre D.R., Dileanis S., Flynn J.M., Grattapaglia D., Guthrie A., Harper C., Karttunen P.L.,
40
41 Kimura H., Lewis G.M., Longeri M., Meriaux J.-C., Morita M., Morrin-O'Donnell R.C., Niini
42
43 T., Pedersen N.C., Perrotta G., Polli M., Rittler S., Schubbert R., Strillacci M.G., Van Haeringen
44
45 H., Van Haeringen W. & Lyons L.A. (2007) An international parentage and identification panel
46
47 for the domestic cat (*Felis catus*). *Animal Genetics* 38, 371-377.
48
49
50
51 Liu Z.J. & Cordes J.F. (2004) DNA marker technologies and their applications in aquaculture
52
53 genetics. *Aquaculture* 238, 1-37.
54
55
56
57
58
59
60

- 1
2
3 Lo Presti R., Lisa C. & Di Stasio L. (2009) Molecular genetics in aquaculture. *Italian Journal of*
4
5 *Animal Science* 8, 299-313.
6
7
8 Lynch M. & Walsh B. (1998) Genetics and Analysis of quantitative traits. Sinauer Associates,
9
10 Sunderland (Massachusetts), USA, 980 p.
11
12
13 McKelvey K.S. & Schwartz M.K. (2004) Genetic errors associated with population estimation
14
15 using non-invasive molecular tagging: problems and new solutions. *The journal of wildlife*
16
17 *management* 68, 439-448.
18
19
20
21 Markoulatos P., Sifakas N. & Moncany M. (2002) Multiplex Polymerase Chain Reaction: A
22
23 Practical Approach. *Journal of Clinical Laboratory Analysis* 16, 47-51.
24
25
26 Marshall T.C., Slate J., Kruuk L.E.B. & Pemberton J.M. (1998) Statistical confidence for
27
28 likelihood-based paternity inference in natural populations. *Molecular Ecology* 7, 639-655.
29
30
31 Miquel C., Bellemain E., Poillot C., Bessièrè J., Durand A. & Taberlet P. (2006) Quality indexes
32
33 to assess the reliability of genotypes in studies using noninvasive sampling and multiple-tube
34
35 approach. *Molecular Ecology Notes* 6, 985-988.
36
37
38
39 Navarro A., Oliva V., Zamorano M.J., Ginés R., Izquierdo M.S., Astorga N. & Afonso J.M.
40
41 (2006) Evaluation of PIT system as method to tag fingerlings of gilthead seabream (*Sparus*
42
43 *auratus* L.): effects on growth, mortality and tag loss. *Aquaculture* 257, 309-315.
44
45
46 Navarro A., Badilla R., Zamorano M.J., Pasamontes V., Hildebrandt S., Sánchez J.J. & Afonso
47
48 J.M. (2008) Development of two new microsatellite multiplex PCRs for three sparid species:
49
50 Gilthead seabream (*Sparus auratus* L.), red porgy (*Pagrus pagrus* L.) and redbanded seabream
51
52 (*P. auriga*, Valenciennes, 1843) and their application to paternity studies. *Aquaculture* 285, 30-
53
54 37.
55
56
57
58
59
60

- 1
2
3 Navarro A., Zamorano M.J., Hildebrandt S., Ginés R., Aguilera C. & Afonso J.M. (2009a)
4
5 Estimates of heritabilities and genetic correlations for body composition traits and G×E
6
7 interactions, in gilthead seabream (*Sparus auratus* L.). *Aquaculture* 295, 183-187.
8
9
10 Navarro A. Zamorano M.J., Hildebrandt S., Ginés R., Aguilera C. & Afonso J.M. (2009b)
11
12 Estimates of heritabilities and genetic correlations for growth and carcass traits in gilthead
13
14 seabream (*Sparus auratus* L.), under industrial conditions. *Aquaculture* 289, 225-230.
15
16
17 Neff B.D., Fu P. & Gross M.R. (2000) Microsatellite multiplexing in fish. *Transactions of the*
18
19 *American Fisheries Society* 129, 584-593.
20
21
22
23 Nei M. (1987) *Molecular Evolutionary Genetics*. Columbia University Press, New York. 512 p.
24
25
26 Perlin M.W., Lancia G. & See-Kiong Ng. (1995) Toward fully automated genotyping: genotyping
27
28 microsatellite markers by deconvolution. *American Journal Human Genetics* 57, 1199-1210.
29
30
31 Piñera J.A., Bernardo D., Blanco G., Vázquez E. & Sánchez J.A. (2006) Isolation and
32
33 characterization of polymorphic microsatellite markers in *Pagellus bogaraveo*, and cross-species
34
35 amplification in *Sparus aurata* and *Dicentrarchus labrax*. *Molecular Ecology Notes* 6, 33-35.
36
37
38 Pompanon F., Bonin A., Bellemain E. & Taberlet P. (2005) Genotyping errors: causes,
39
40 consequences and solutions. *Nature Reviews Genetics* 6, 847-859.
41
42
43
44 Porta J., Porta J.M., Béjar J. & Álvarez M.C. (2010) Development of a microsatellite multiplex
45
46 genotyping tool for the fish Gilthead seabream (*Sparus aurata*): applicability in population
47
48 genetics and pedigree analysis. *Aquaculture Research* 41, 1514-1522.
49
50
51 PROGENSA (2009) Desarrollo de un Programa Piloto de Mejora Genética en Dorada (*Sparus*
52
53 *aurata* L.). Ministerio de Medio Ambiente, Rural y Marino (MARM) Secretaria de la Junta
54
55 Nacional Asesora de Cultivos Marinos (JACUMAR), España.
56
57
58
59
60

1
2
3 Rachlin J., Ding Ch., Cantor Ch. & Kasif S. (2005) MuPlex: multi-objective multiplex PCR assay
4
5 design. *Nucleic Acids Research* 33, Web Server issue.
6
7

8 Sánchez J.J., Borsting C., Hallenberg C., Buchard A., Hernández A. & Morling N. (2003)
9
10 Multiplex PCR and minisequencing of SNPs-a model with 35 Y chromosome SNPs. *Forensic*
11
12 *Science International* 137, 74-84.
13
14

15 Selkoe K.A. & Toonen R.J. (2006) Microsatellites for ecologists: a practical guide to using and
16
17 evaluating microsatellite markers. *Ecology Letters* 9, 615-629.
18
19

20 Senger E., Priat C., Hitte C., Sarropoulou E., Franch R., Geisler R., Bargelloni L., Power D. &
21
22 Galibert F. (2006) The first radiation hybrid map of a perch-like fish: the gilthead seabream
23
24 (*Sparus aurata* L). *Genomics* 87, 793-800.
25
26
27

28 Sobel E., Papp J.C. & Lange K. (2002) Detection and integration of genotyping errors in statistical
29
30 genetics. *American Journal Human Genetics* 70, 496-508.
31
32

33 Taberlet P., Griffin S. & Goossens B. (1996) Reliable genotyping of samples with very low DNA
34
35 quantities using PCR. *Nucleic Acids Research* 24, 3189-3194.
36
37
38

39 Van de Goor L.H.P., Panneman H. & Van Haeringen W.A. (2009a) A proposal for standardization
40
41 in forensic bovine DNA typing: allele nomenclature of 16 cattle-specific short tandem repeat
42
43 loci. *Animal Genetics* 40, 630-636.
44
45

46 Van de Goor L.H.P., Panneman H. & Van Haeringen W.A. (2009b) A proposal for
47
48 standardization in forensic equine DNA typing: allele nomenclature for 17 equine-specific STR
49
50 loci. *Animal Genetics* 41, 122-127.
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3 Vandeputte M., Mauger S. & Dupont-Nivet M. (2006) An evaluation of allowing for mismatches
4 as a way to manage genotyping errors in parentage assignment by exclusion. *Molecular Ecology*
5 *Notes* 6, 265–267.
6
7
8

9
10 Vandeputte M., Rossignol M.N. & Pincet C. (2011) From theory to practice: Empirical
11 evaluation of the assignment power of marker sets for pedigree analysis in fish breeding.
12 *Aquaculture* 314, 80-86.
13
14
15

16
17 Villanueva B., Verspoor E. & Visscher P.M. (2002) Parental assignment in fish using
18 microsatellite genetic markers with finite numbers of parents and offspring. *Animal Genetics* 33,
19 33-41.
20
21
22
23

24
25 Vogiatzi E., Lagnel J., Pakaki V., Louro B., Canario A.V.M., Reinhardt R., Kotoulas G.,
26 Magoulas A. & Tsigenopoulos C.S. (2011) In silico mining and characterization of simple
27 sequence repeats from gilthead sea bream (*Sparus aurata*) expressed sequence tags (EST-SSRs);
28 PCR amplification, polymorphism evaluation and multiplexing and cross-species assays. *Marine*
29 *Genomics* 4, 83-91.
30
31
32
33
34
35

36
37 Weeks D. E., Conley Y. P., Ferrell R. E., Mah T. S. & Gorin M. B. (2002) A tale of two
38 genotypes: consistency between two high-throughput genotyping centers. *Genome Research* 12,
39 430-435.
40
41
42
43

44
45 Wilson A.J. & Ferguson M.M. (2002) Molecular pedigree analysis in natural populations of
46 fishes: approaches, applications, and practical considerations. *Canadian Journal of Fisheries and*
47 *Aquatic Sciences* 59, 1696-1707.
48
49
50

51
52 Yuryev A., Huang J., Pohl M., Patch R., Watson F., Bell P., Donaldson M., Phillips M.S. &
53 Boyce-Jacino M.T. (2002) Predicting the success of primer extension genotyping assays using
54 statistical modeling. *Nucleic Acids Research* 30, e131.
55
56
57
58
59
60

Table 1. Microsatellite markers selected as adequate in this study: Internal code (IC), *Loci* names, *loci* accession number in GenBank (Accession), fluorochromes and primer sequences.

IC	Locus	Accession	Redesigned forward primer sequence (5'→3')	Redesigned reverse primer sequence (5'→3')
5'6-FAM				
B 1	Cld-24-H	DQ851306	AGATCCCTCACTGCAGCAA	gtttAGTCTGCATGTTTATATGAGAGCAA
B 3	Gt57	DQ851386	CCTGACTCTTACCCAGTCG	gtttAATTAACCTCTGTGCTGCATTCTG
C 1	Did-14-H	DQ851338	CCTTGAAAAGGACACTCACTGATAG	gtttATCCCCGTGTCCGAATGA
C 2	Fd-48-F	DQ851374	ATTACAGCCAGAGGACTGGAGAG	gttTCAGAGAGAGTGTTCTGTGTATCTG
C 3	Eld-39-T	DQ851367	GAAGTGTGTGAGAGGACAGTTG	GAAGGAAAAATCTGATTGGAGTTC
C 4	Saimbb16	AJ418652*	ACCTGTTTCTTTGATTTGTTC	gtttCATAACAGCAGGATAGGTCAGACT
D 2	Saimbb26	AJ418656*	CAATGGCAAAAGCAATGG	gtttAAGTGACGACCGCAGTGTGA
D 4	P3	DQ851284	GAGGGGACACGTAATTTGG	gtttAACAACAGTCAAATGCTGAGTTGT
E 1	Bd-68-T	DQ851270	AGGGGCGTTTCAGTTC	gtttAGGTGAGTCCGTCATCAGTGTAT
E 3	Fd-81-F	DQ851377	GGCTGGACATGCTTTCATAGAT	gtttAGCGCTTGAAGATAAAAACAACTCT
F 1	Bt96	DQ851295	TCCAGCTTGGGATCAATAAAGTA	GCTAGTTTTCTGAAACAGTCATTT
F 2	Cld-26-H	DQ851307	ATGTGAAACAGAGTGGAAAGAAAAC	gtttAGACGACAGACAAAAGACCAGT
G 2	Cld-03-F	DQ851301	ATGACTAAACATCACGTTTCATGGAT	gtttAGCTCATGGCTAACTGTGTACTTTT
G 3	Hd-23-T	DQ851391	TCTAATTTCTTTGAGGTCCTCTT	GAGGACAAGCTGAAGTACAGGCTC
H 1	P19	DQ851285	GGATCTGCAATATCCACAGTCAG	gtttCTGGATGCAAAAGCTTTCGTG
H 2	Dd-56-F	DQ851326	GTAGTGTGGAACAAGACAAAAG	gtttCGTCATCCAAAATCTTTATCTCTC
I 2	Fd-78-H	DQ851375	CATTTACAGCTAATGCTCAGAGAAA	GTGACTGAAGACAGGTATGAGCAC
J 1	P96	DQ851292	CGCAATTTAGAAAGTAGGAGACTGG	gttTGCCAGATGCAGGATGTAGG
J 2	Did-24-T	DQ851343	AGAGAGCTTCACTGACCCTGAG	GCTGAAAACGTGGTTTTGTATGATA
J 3	Bd-06-H	DQ851259	GGCATCAGCAGCAACCCAG	gtttAGGTAATACCACCCTGTCTAC
K 2	Dd-84-H	DQ851331	GGGTGATGAAATTCGTTGGAC	gttTCTCTTTTCCAGACACATTTACTACA
K 3	Eld-13-H	DQ851361	CTGACAAATCTGAAGATCTGAATACTG	GATCCTCTGCTCATCCATCTG
5'NED				
A 5	Bt-14-F	DQ851293	AGCCGAGTACTTCTACTCCTCTGAT	gtttAGTGAGGGCGGACAGATAAAG
B 6	Dt23	DQ851346	ACACAACACACGATTACAGCAGA	gttTCCATGTGAGATGTCACCTTATTTCT
D 6	Fd-42-T	DQ851372	TCCAAGAGTGTGAGCAGTCTAATCT	gtttCAGGTCCAACCTGCTATCAATTA
E 4	Bld-18-F	DQ851280	AGTGATGCGCTCTGGGTTTTA	GTCCTCAGCCTTTGAAGTGTATC
E 5	Ef6	AJ418667*	AGAACAATGAACCTCAGCAACTTTC	gtttAGTCTCCTGTGTTTATGATGACTGC
E 6	Sai21	AY322112**	TCAGAGCAGAGCTGTGATTGTAT	gtttACCGAAGCTGATTGTGTGAGT
F 3	Saimbb25	AJ418675*	AGGAAGATGACAGTGGAAACATTAG	gtttCCCTACCTTTTCTCTTCAACTCA
G 4	Cld-14-F	DQ851304	ATGTGAGTGCACACGTTGGAG	gtttCTGTGTCAGGTATATGGAAGAACAATG
G 5	Gd-67-H	DQ851383	CAAGCTCAGGTGTAGCATTAGTCTT	gtttAACTGGTTAGGAGTGTGCTAAATG
H 4	B26b	DQ851254	TTGACTTGACCAATATCTCACTCT	gttTCTCAGGTGACTAAACAGTGAACAG
H 5	Hd-15-H	DQ851390	CTCTCTCATGCGCACTTCTT	gtttCACTCCTCTGATTTATGAGATGAT
I 4	Bd-08-F	DQ851260	GAGACAGCAGGTCGCTCATC	GACAGAGACTAAAGCTCGACGAA
J 8	Bd-48-T	DQ851265	CAGGGAACAACAATGCTG	gttTCCGACAGGTTGACATATATCAG
J 9	Fd-46-T	DQ851373	ATTTGACTTGATGATCAGCTGTG	gTTTTCTGGAGTATGACTGAAAGACA
K 7	Cld-65-H	DQ851315	ATTTATACCACAGCTCAATGACACC	gtTTCCTTCTCGTTTATGTAAGTCTGC
K 8	SAI15	AY322110**	CTGTCTTCTGTCCCTCACACTTAT	gtttCTCAGTTGAAGCACTTCTGTAAAGTC
L 7	Dd-57-T	DQ851327	ATCATTTGTCAGATAATGGGACAC	gtTCAAAAATCTTTTGGCTGTGTC
M 5	Ct27	DQ851320	GAGACAGAGAGGAAGAAAAGGATT	gtttCAATGCTACAAAGCTGCCTCAG
M 6	Fd10	DQ851370	ACCACCTCAACAATGACAGGCTAGT	GGGATCTGAAACATGAGAGAGAC
M 7	Saimbb20	AJ418655*	GCTGTCTCTACGCTTTCAGCTC	gtttACTTTGCATTTCCCTGCCTAT
5'PET				
A 8	C90b	DQ851299	ACAGAGTCAAGCAGCGGATAAC	gtttCGACCTGCTGAGGAGAACA
A 9	Ad-07-H	DQ851247	AGATTACTTACTCCTAATGTGGTAGTGA	gtttCTTCTCTGTCTGTCTTTCACG
B 8	Hd-33-F	DQ851394	TGAGTCTACAAGCCAGAACA	gttTAAGAGAATAAAGCTCTGCCTGTGC
C 9	Id-39-H	DQ851407	ACCAAACAGACAGCTGAAGGTTAC	gtttACATTTAGAAAAAGGGAGGATCG
C 10	Eld-38-F	DQ851366	TCTGAATAAAACATTGTCTGCAGTG	gtttCTCAGACGGAGTATTTTGGAAACA
D 9	Cld-44-T	DQ851312	CTTTGACTCCTGACCTCTTAATCC	gtttCAGAGTCAGTTCTTCTCTGTGT
D 10	SAGT26	Y17266***	GGTTCAGTTTGGAGTATGTTTGAA	gttTCAGCTATAGAGATGCTGTGTTCTC
E 8	Hd-70-H	DQ851399	TACACACACACTCTCTCTTCCAGG	gtttATGGAAGAGGCAAGAAATCTTTT
F 4	P54	DQ851289	TGCTCTCTATTGTCCTCTCTCCTC	gttTGCACCTACAGCGGCATC
F 5	Id-11-H	DQ851402	GAATGTCTGTAATGTTTGCCTGT	GGTCAATTCAACATATCATCCATC
F 6	Hd-25-F	DQ851392	AACGGTGTCTCTATTTCCTATT	GCAGGAATATATCTATGCTGCTCAAA
G 6	Cld-52-T	DQ851314	GTAATCCAAGTGTAGAGTGACG	gttTCCCTATTAACATGAATGAGGCTGTT
G 7	Eld-11-H	DQ851360	TGAAAATCACACAACCTGGATGC	gtttAGAGAGCAGAAGAAGAGACGAGTTA
H 6	Did-09-F	DQ851336	TATTAGCCGCTAAATGTAGGTTCTT	gtttCTGACAAGAGGCTGACAGGAG
H 7	Did-07-H	DQ851335	CGACAACAGTCAGGAGTAACAGAT	GCCTGGTCAACCCTGAAAC
I 5	Cld-71-T	DQ851316	CGCGTGAAAGACTACCTTGAATACTA	GTGTTGTGACAGAAAATGACAGGA
I 6	Bd-58-F	DQ851267	GGGATAATAACCTGTAAGTGAGCAA	gtttCAATGTTCCCACTCACATCC
J 10	Cld-11-T	DQ851303	CGTGTGAAGTTGTGTTAAGTTGTG	GATGGACACGGTGGTTTAAACA
J 11	Ad-54-F	DQ851243	GTGCATTTCAATTGACAGAAAGAGAT	gtttCAACAGTGTCAATGCTGGAG
L 11	Did-16-F	DQ851339	GTTGTAGATCGGAGTGTGATAACG	gttTGTCTCCGAGTAAGCCATATGTA
M 9	Hd-45-F	DQ851396	ACATACACCAGGCGGCATAG	GTTGGAATAGCATTTGGGACTT
5'VIC				
A 11	Dd-16-T	DQ851323	ACACACATTTAGGGACCATATC	gtttAGATTGCGGAAGAAGTATGAGAGAC
A 12	Ad-12-F	DQ851239	GAGCCATTTCAAGTTTTATTGGTTC	GCCATCCAGCTGGTCCTC
C 12	Dt47	DQ851347	TGCCTCTTTCACTCACTTCTC	GCACATTGCTCCACACAGAG
D 11	Cld-29-T	DQ851308	GCTCAGCACTACTTTAGTGTTTTGG	gtttCTGCAGGGAGGAAAACAAGAC
D 12	Eld-41-H	DQ851368	GATTCCCATCCTTTGTAAGTTGAT	GAGGACGACCTCAACCTCATAAC
D 13	Saimbb18	AJ418632*	GTCAGTGATGACATACAGATCACCT	gtttAGTTCACACTTAAAGGGCAGAGTT
E 9	Fd-92-H	DQ851379	TAGAGAAAGGCAATTTGTCAATGAG	GCATCAGACAGACGGGTACAGT
F 7	Hd-77-F	DQ851400	CATGTGTTGTTTGTGTCAGAGTG	gtttCAACATACATGCTACTGAGGAAAG
G 9	Did-31-H	DQ851345	AACAACAGCGTGTCTCAGAAC	GAAAACCTAAGGCCCTATTGG
H 8	P60	DQ851290	ATGCTGACATAACACAATGTAGCTC	GAGAAGTGAGGGGATACCTGAG
I 7	Fd-90-H	DQ851378	CAGACTGAGGAGATGGAGGAGAC	gtttAGACTCTGTGTTTGGTACAGCAGAT
I 8	B13b	DQ851252	ATGACAGTGTGTTGAGCTCAGTGTTA	gtttCCTGCTTCCAGCTTTCAGAT
I 9	At37	DQ851250	GGTTAGGGTAATCAGAAATGCAATG	gtttCTTCCAGTCAAGTCAATAAAG
K 4	Eld-08-H	DQ851358	CTGTTGACGTGGTACTGAAATACATC	GGAAGTTCTGAAAGATAAAGAACC
K 6	B82b	DQ851257	GCAGAGCAGTGGAAAGCAAG	gttTCCCTCTCTGTGCTTTTACTA
M 3	Bld-04-F	DQ851276	GATCTCATTATGACGGATCATTAGC	gtttATCTTTGTCCGATGTTTTCAC
M 4	Did-22-F	DQ851342	GGTCAGATAGTTTCACTGATGATTC	gtttTCCCTCTACCTCCCAATAAGT

All markers were originally described by Franch *et al.* (2006), except those indicated with an asterisk (Argyrokastritis *et al.*, 2002), two asterisks (Brown *et al.*, 2005) or three asterisks (Batargias *et al.*, 1999).

Table 2. Genetic information of the optimized Super-Multiplexes on gillhead seabream (SMsa1 and SMsa2): Internal code, fluorochrome, linkage group, type of nucleotide motif, primer concentration, allele size range, number of alleles, observed and expected heterozygosity, polymorphism information content and the genotype of reference sample (Ref-sa) for each microsatellite markers.

Internal Code	Fluoro-chrome	LG	Nucleotide motif	Concentration (μ M)	Allele size range in bp	N° alleles	Observed Heterozygosity	Expected Heterozygosity	Polymorphism Information Content	Genotype of reference sample
SMsa1										
E1	5' 6-FAM	23	di	0,02	72-90	24	0,829	0,778	0,741	78/84
C3	5' 6-FAM	6	di	0,06	104-164	8	0,907	0,937	0,931	128/140
D4	5' 6-FAM	1	di	0,09	171-207	12	0,698	0,829	0,808	199/203
E4	5* NED	11	di	0,06	64-92	4	0,824	0,837	0,819	78/84
A5	5* NED	20	di	0,03	106-112	27	0,624	0,622	0,547	108/110
M5	5* NED	24	tetra	0,08	128-232	6	0,844	0,884	0,873	136/192
L11	5* PET	10	di	0,07	103-113	7	0,727	0,714	0,661	107/109
F6	5* PET	3	di	0,09	130-144	8	0,488	0,498	0,471	140/140
D11	5* VIC	5	di	0,03	76-92	9	0,800	0,807	0,783	76/90
C12	5* VIC	18	di	0,03	121-137	10	0,600	0,610	0,579	123/131
I9	5* VIC	19	tetra	0,04	142-178	13	0,766	0,790	0,757	154/162
SMsa2										
J1	5* 6-FAM	5	di	0,06	76-102	8	0,848	0,828	0,801	84/88
G2	5* 6-FAM	13	di	0,06	113-137	13	0,732	0,808	0,786	117/119
G3	5* 6-FAM	26	di	0,03	150-170	8	0,607	0,667	0,613	164/170
L7	5* NED	16	di	0,05	76-80	3	0,330	0,359	0,312	78/78
H5	5* NED	25	di	0,07	91-123	15	0,884	0,894	0,881	119/119
B6	5* NED	20	tetra	0,05	140-208	16	0,911	0,905	0,893	164/176
F4	5* PET	14	di	0,09	66-90	10	0,670	0,777	0,741	74/82
C10	5* PET	23	di	0,09	127-161	16	0,848	0,858	0,840	135/155
M3	5* VIC	7	di	0,05	83-95	6	0,705	0,702	0,653	87/89
H8	5* VIC	19	di	0,02	108-116	3	0,580	0,664	0,587	114/116
I8	5* VIC	3	di	0,06	128-144	9	0,813	0,757	0,729	134/136

μ M: microMolar; LG: Linkage Group; bp: base pair

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

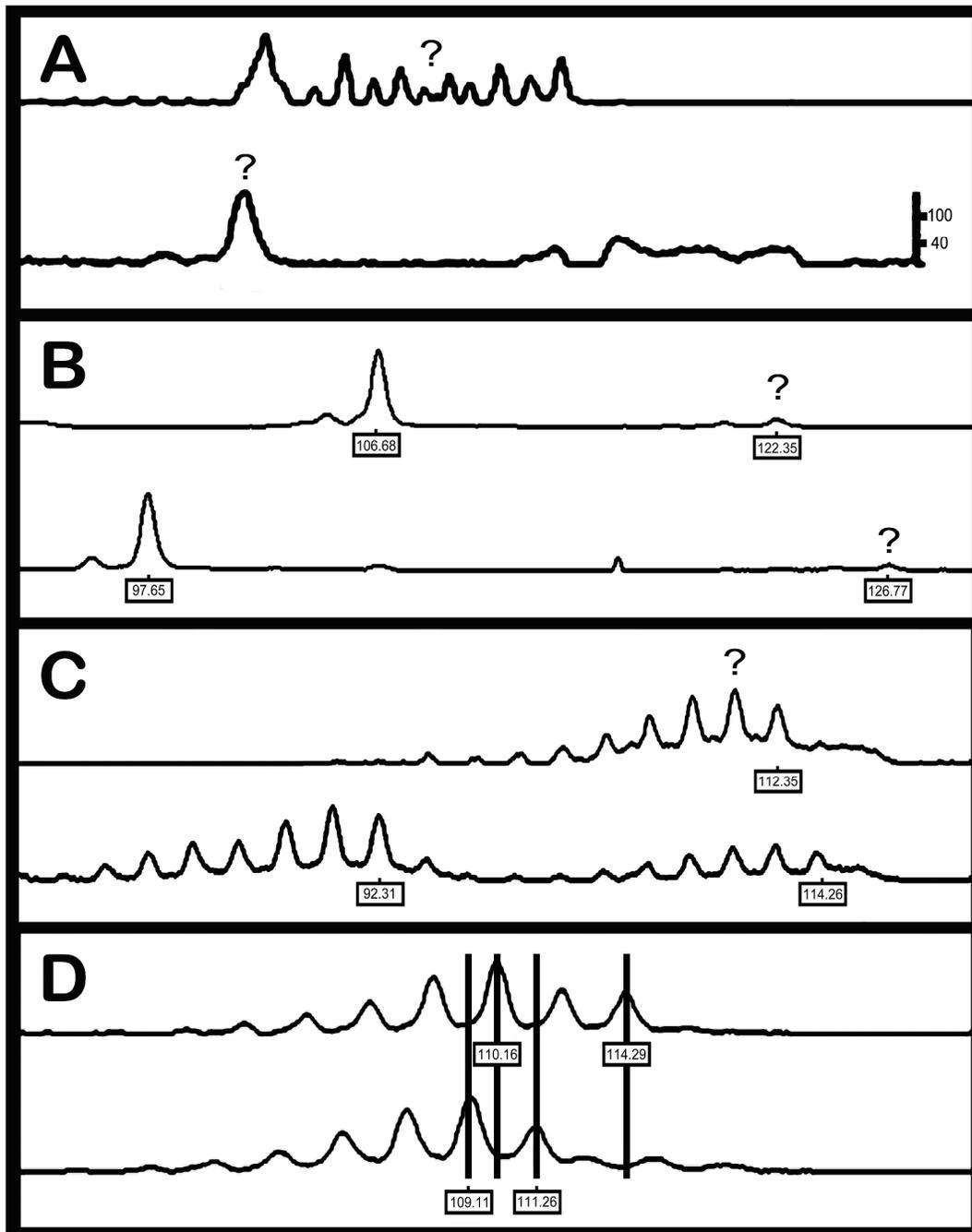


Figure 1 Potential genotyping errors during the process of peak scoring: according to peak scoring; a) inadequate amplification, b) long allele dropout, c) unclear banding pattern, according to allele calling, d) intermediate alleles.

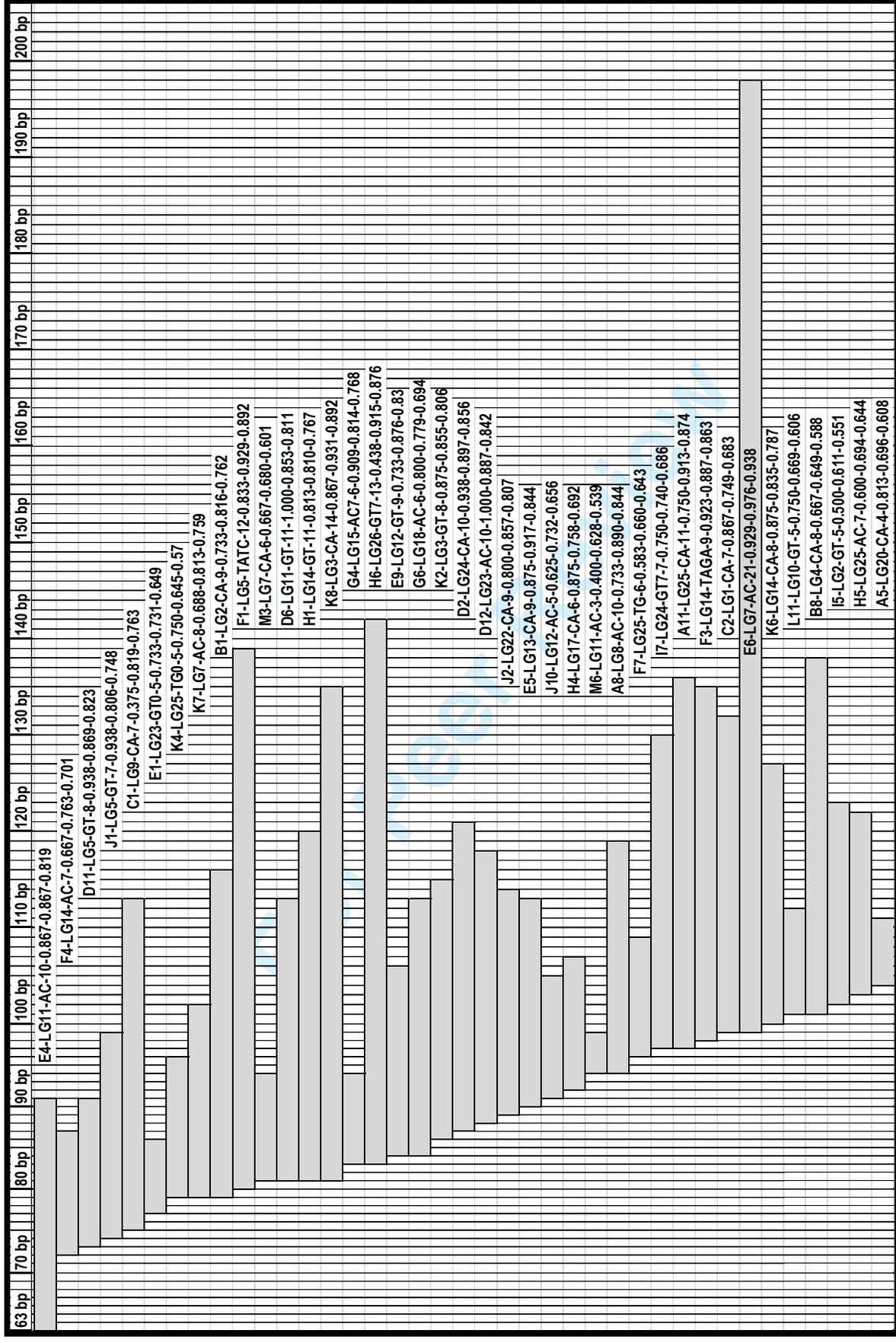


Figure 2 Genetic variability of the adequate marker of this study, arranged according to their allele size range and labelled in the following order: Name (Internal code)- Linkage group-Major nucleotide motif - Number of alleles - Observed heterozygosity - Expected heterozygosity - Polymorphism Information Content.

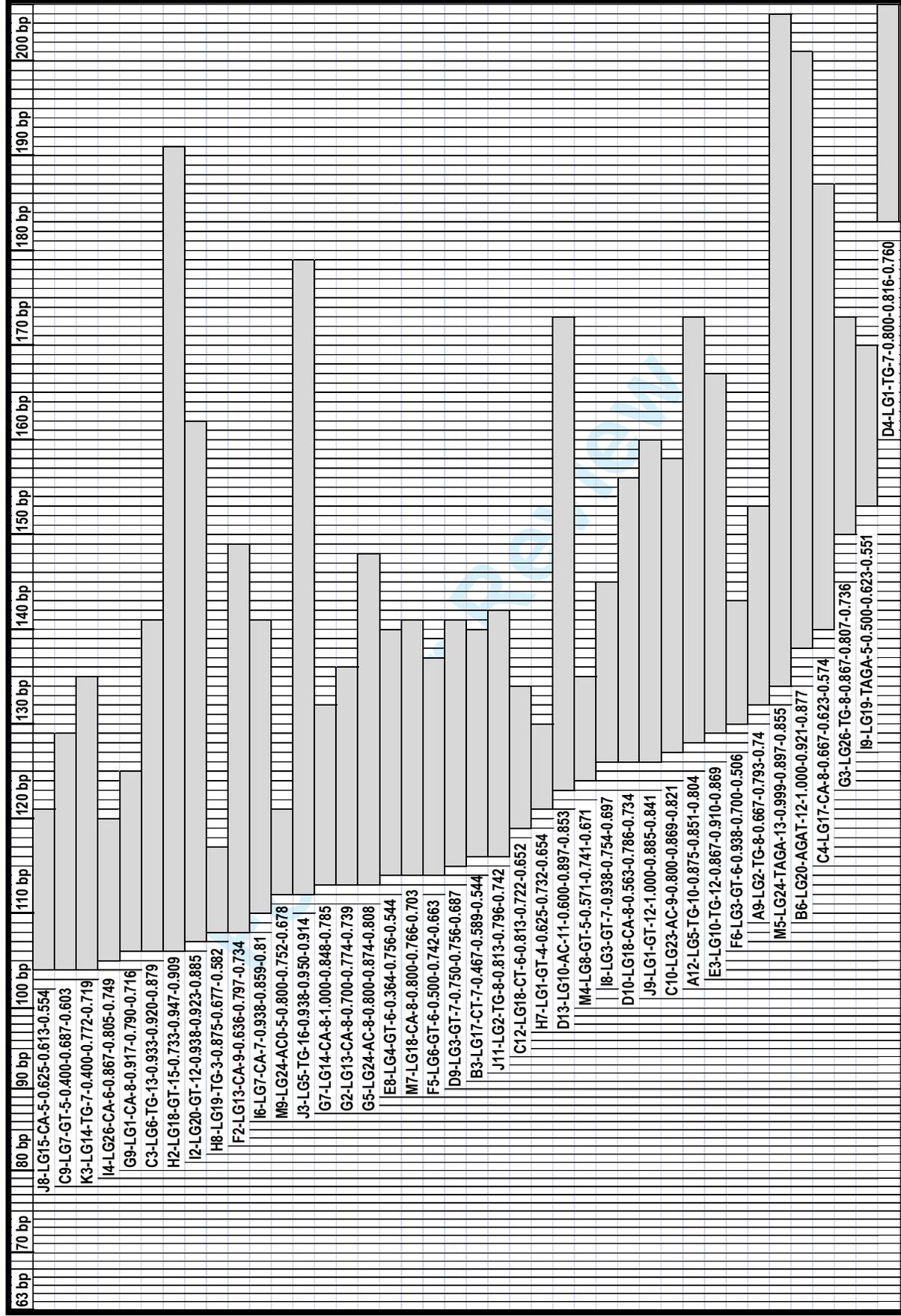


Figure 2 (Continued)