



UNIVERSIDAD DE LAS PALMAS DE GRAN CANARIA



Anexo I

D^a MARÍA SORAYA DÉNIZ SUÁREZ, SECRETARIA DEL INSTITUTO UNIVERSITARIO DE SANIDAD ANIMAL Y SEGURIDAD ALIMENTARIA DE LA UNIVERSIDAD DE LAS PALMAS DE GRAN CANARIA.

CERTIFICA

Que el Consejo de Doctores del Departamento en su sesión de fecha 31 de mayo de 2012 tomó el acuerdo de dar el consentimiento para su tramitación, a la tesis doctoral titulada: **“Estimación de parámetros genéticos en corvina, *Argyrosomus regius*, para caracteres de crecimiento, rendimiento y calidad de la carne y del pez”**, presentada por el doctorando D. **Mohamed Soula** y dirigida por el Dr. **Juan Manuel Afonso López** y Dra. **María Jesús Zamorano Serrano**.

Y para que así conste, y a efectos de lo previsto en el Artº 73.2 del reglamento de Estudios de Doctorado de esta Universidad, firmo la presente en Las Palmas de Gran Canaria, a uno de junio de dos mil doce.



Anexo II

UNIVERSIDAD DE LAS PALMAS DE GRAN CANARIA

Departamento: Instituto Universitario de Sanidad Animal y Seguridad Alimentaria

Programa de Doctorado: Acuicultura: Producción controlada de animales acuáticos

Título de la Tesis:

“Estimación de parámetros genéticos en corvina, *Argyrosomus regius*, para caracteres de crecimiento, rendimiento y calidad de la carne y del pez”

Tesis Doctoral presentada por **D. Mohamed Soula**

Dirigida por el **Dr. Juan Manuel Afonso López** y por la **Dra. María Jesús Zamorano Serrano**

El Director,

La Directora,

El Doctorando,

**Juan Manuel Afonso
López**

**María Jesús Zamorano
Serrano**

Mohamed Soula

Las Palmas de Gran Canaria, 01 de junio de 2012

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

INFORMA:

Que **Mohamed Soula**, Ingeniero en Acuicultura, ha realizado bajo mi dirección y asesoramiento, el presente trabajo titulado **Estimación de parámetros genéticos en corvina, *Argyrosomus regius*, para caracteres de crecimiento, rendimiento y calidad de la carne y del pez**, el cual considero reúne las condiciones y la calidad científica para optar al grado de Doctor.

En Arucas, a día de 24 de Mayo de 2012.

Fdo.: Juan Manuel Afonso López

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

INFORMA:

Que **Mohamed Soula**, Ingeniero en Acuicultura, ha realizado bajo mi dirección y asesoramiento, el presente trabajo titulado **Estimación de parámetros genéticos en corvina, *Argyrosomus regius*, para caracteres de crecimiento, rendimiento y calidad de la carne y del pez**, el cual considero reúne las condiciones y la calidad científica para optar al grado de Doctor.

En Arucas, a día de 24 de Mayo de 2012.

Fdo: María Jesús Zamorano Serrano

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ
الْحَمْدُ لِلَّهِ رَبِّ الْعَالَمِينَ ۝ الرَّحْمَنُ الرَّحِيمُ ۝
مَلِكُ يَوْمِ الدِّينِ ۝ إِيَّاكَ نَعْبُدُ وَإِيَّاكَ نَسْتَعِينُ ۝
اهْدِنَا الصِّرَاطَ الْمُسْتَقِيمَ ۝ صِرَاطَ الَّذِينَ أَنْعَمْتَ
عَلَيْهِمْ ۝ غَيْرِ الْمَغْضُوبِ عَلَيْهِمْ وَلَا الضَّالِّينَ ۝

Dedicatoria

A mi Madre, mi Padre,
mis hermanos, mi carí
a la memoria de mis abuelas
y a todos lo que han muerto
para sentirnos libres

Agradecimientos

Ante todo querré agradecer a Dios, por estar conmigo en cada momento de mi vida, por ayudarme a terminar este trabajo, gracias por darme la fuerza, la paciencia y el coraje para hacer este sueño realidad.

La presente Tesis es un esfuerzo en el cual, directa o indirectamente, participaron varias personas leyendo, opinando, corrigiendo, teniéndome paciencia, dando ánimo, acompañando en los momentos de crisis y en los momentos de felicidad por ello agradezco:

A mi director y mi directora de tesis por haber confiado en mi persona, por la paciencia y por la dirección de este trabajo. Gracias Juanma por haber aguantado mi carácter durante estos años, por transmitirme mucho de lo que sabes, por estar cerca cuando las cosas se complicaban y por hacerme sentir uno de la familia. Gracias María Jesús por tu apoyo, tu disposición, tus consejos siempre que lo necesité, por respaldarme en los momentos críticos, y por ajustar siempre la balanza entre el optimismo (Juanma) y el pesimismo (yo).

A Rafa, por apoyarme y dirigirme en todos los análisis "de calidad", por estar fileteando y resolviendo problemas durante los muestreos. Gracias por darme este toque de confianza cada vez que pasas al laboratorio.

A mis compañeros de laboratorio, o mejor dicho a mi segunda familia. Quiero que sepan lo bastante difícil expresar mis sentimientos a todos y cada uno de vosotros. Gracias Ana, por ser como es, dispuesta a ayudar, a estar cuando las cosas se ponen feas y por apoyarme durante cada una de las tareas. Gracias Davi, por darme este punto de alegría que me faltaba casi siempre, por la ayuda y el apoyo que me has transmitido, claro a tu manera. Gracias Laura, por poner el laboratorio pata arriba cuando estás y por

transmitir a este grupo la energía y la alegría que necesita y ahora más con nuestra nueva alegría Iria. Gracias Manola, por ayudarme y apoyarme durante toda la parte del laboratorio, por tu forma de hacer que todo vaya más ordenado y con pautas, sin tu ayuda seguramente que esta tesis habría durado más. Gracias, Silvia H., Ivon, Guaci, Sara, Fefi, Mónica, Tibi, Juan, Fran, Fátima, Bruno, Moneiba por vuestra ayuda durante los muestreos y cada vez que os he necesitado.

A Eyed, Rachid, Aymen, Khouloud, Fatima, Islam, Reda y a toda la comunidad Arabic que ha pasado por este grupo y que he tenido la oportunidad de conocer. Gracias a todos por hacer más fácil vivir lejos de nuestras familias y nuestra cultura.

A Imed, Hatem, Kamilia, Wala y Imen por ser mis amigos, por apoyarme misma si las distancias nos separa. Espero que esta amistad dure muchísimo más hasta que nos encontraremos otra vez en nuestra tierra querida.

A Alex y Silvia por su amistad, por su apoyo, por ser parte de mi familia aquí, por aguantarme durante mis periodos de crisis y por ser tan amables conmigo desde el primer día que hemos compartido una clase de máster juntos. A Borja y Oscar por la amistad que nos une y por los momentos que pasamos juntos.

A Samu por la ayuda que me ha aportado durante los muestreos, y a Pilu por aguantarnos en su casa durante las horas de correcciones.

A todos los miembros del Grupo de Investigación en Acuicultura por aceptarme como uno de ellos. Un especial agradecimiento a los técnicos de la nave de cultivo del ICCM, a Ada, Dailos, Desiré, Emma, que me ayudaron durante el periodo de cultivo y que han mostrado siempre mucha disponibilidad. A Carmen y su pequeño grupo que me ha ayudado siempre y cuando lo pedía. A D. Javier Roo por proporcionarme los peces y por sus

consejos para la cría de éstos. A todos los becarios del IUSA que en algún momento de estos 4 años hemos compartido buenos momentos.

A todos los técnicos, conserjes y trabajadores del modulo 7 de la Facultad de Veterinaria, por su colaboración y disponibilidad. A todo el Grupo de Parasitología, los vecinos de al lado por dejarme usar los aparatos sin ninguna pega y por la amabilidad que transmiten. A todos los miembros del Grupo de Producción por aguantarnos y al olor del pescado durante el mes de muestreo.

A todo el Grupo de Genética Forense, José Pestano, Nico, Monica, Yessi y a todos los técnicos y becarios que me facilitaron los resultados de las muestras de secuenciación y por haber sido muy amables y muy comprensivos.

A la empresa, CANEXMAR y especialmente a Rafa y su tripulación por hacernos un hueco dentro de su equipo cada vez que hemos necesitado su ayuda. A la empresa ADSA por su ayuda y por hacernos fácil nuestras tareas de trabajo.

A la Agencia Española de Cooperación Internacional que ha confiado en mis posibilidades y me ha ofrecido la beca para realizar mi tesis durante estos cuatro años. También, al Proyecto ACISII-PI2007/052 y el proyecto ULPGC-2010 que financiaron parte de esta tesis.

Como empecé agradeciendo a mi familia, quería acabar agradeciendo a mi otra familia. A mi querida y amor Cris que me ha aguantado durante estos últimos años, que me hizo ver la vida desde un lado más alegre, que me ha animado cuando estaba de bajón y ha saltado conmigo de alegría con cada buena noticia que hemos recibido, espero que esta relación dure por toda la vida y seguiremos luchando juntos por nuestra felicidad. A Carmen, Kini, Miguel y Loles por abrirme las puertas de sus casas y para aceptarme como uno de la familia, espero no fallarles.

Índice

<i>ÍNDICE DE FIGURAS</i>	<i>I</i>
<i>ÍNDICE DE TABLAS</i>	<i>III</i>
<i>RESUMEN</i>	<i>VII</i>
<i>ABSTRACT</i>	<i>XI</i>
<i>RÉSUMÉ</i>	<i>XV</i>
I. Introducción	3
<i>I.1. Acuicultura mundial</i>	3
<i>I.2. La corvina: Características morfológicas</i>	5
<i>I.3. Distribución geográfica</i>	6
<i>I.4. Reproducción y biología de la especie</i>	6
<i>I.5. Historia y situación actual de la acuicultura</i>	7
<i>I.6. Producción mundial y situación del mercado</i>	9
<i>I.7. Justificación</i>	12
<i>I.8. Objetivos</i>	19
II. Materiales y métodos	23
<i>II.1. Marcaje en corvina</i>	23
<i>II.1.1. Experimento marcaje con el sistema PIT</i>	23
<i>II.1.2. Valoración del estrés por marcaje</i>	25
II.1.2.1. Material biológico	25
II.1.2.2. Extracción del RNA y la síntesis del cDNA	27
II.1.2.3. Diseño de los cebadores y secuenciación de los amplicones.	27
II.1.2.4. PCR a tiempo real.....	28
<i>II.1.2. Análisis estadístico</i>	28
<i>II.2. PCRs Multiplex</i>	30
<i>II.2.1. Material biológico</i>	30
II.2.2. Diseño de las Multiplex.....	31
II.2.3. Condiciones de las PCRs.....	38
<i>II.2.4. Análisis de los datos</i>	40

II.3. Estima de heridabilidades y correlaciones genéticas	40
II.3.1. <i>Material biológico</i>	40
II.3.2. Caracteres analizados	44
II.3.3. Análisis de datos.....	48

III. Evaluation of PIT tagging system as method to tag fingerlings of meagre (*Argyrosomus regius*); its effect on growth, survival, tag retention and fish stress....53

III.1. Abstract	53
III.2. Introduction.....	54
III.3. Materials and Methods.....	55
III.3.2. <i>Physical tagging experiments</i>	55
III.3.2.1. Design and conditions	55
III.3.2.1. Growth, mortality and tag retention rates, and wound healing	56
III.3.3. <i>Molecular stress experiments</i>	57
III.3.3.1. Fish rearing and sampling	57
III.3.3.2. RNA extraction and cDNA synthesis.....	57
III.3.3.3. Primer design and amplicons sequencing	58
III.3.3.4. Real-Time PCR	58
III.3.4. <i>Data analysis</i>	59
III.4. Results.....	60
III.4.1. <i>Growth, mortality and tagging loss at different sizes</i>	60
III.4.2. <i>Evaluation of tagging system on fish stress</i>	61
III.5. Discussion	64
III.5.1. <i>Evaluation of tag system</i>	64
III.5.2. <i>Evaluation of PIT tagging system on fish stress</i>	66
III.6. Conclusion	67
III.7. Acknowledgment	67

IV. Genetic variation for growth traits at different ages in meagre (*Argyrosomus regius*), under mass spawning determined parental assignment by using two multiplex PCRs.....71

IV.1. Abstract	71
IV.2. Introduction	73
IV.3. Materials and methods	75

IV.3.1. <i>Biological sampling</i>	75
IV.3.2. <i>Microsatellites</i>	76
IV.3.3. <i>PCR conditions</i>	77
IV.3.4. <i>Data analysis</i>	79
IV.4. <i>Results</i>	81
IV.4.1. <i>Multiplex PCRs</i>	81
IV.4.2. <i>Genetic diversity parameters</i>	81
IV.4.2. <i>Parental assignment</i>	83
IV.4.2. <i>Growth trait</i>	83
IV.4.2. <i>Heritability and correlations</i>	86
IV.5. <i>Discussion</i>	88
IV.5.1. <i>Multiplex PCRs and genetic variation</i>	88
IV.5.2. <i>Parent assignment</i>	90
IV.5.3. <i>Growth</i>	90
IV.5.4. <i>Heritabilities and growth correlation</i>	91
IV.6. <i>Conclusion</i>	92
IV.7. <i>Acknowledgement</i>	93
V. Estimates of heritabilities and genetic correlations for growth and carcass traits in meagre (<i>Argyrosomus regius</i>), under industrial conditions	97
V.1. <i>Abstract</i>	97
V.2. <i>Introduction</i>	99
V.3. <i>Materials and methods</i>	101
V.3.1. <i>Breeding conditions and traits</i>	101
V.3.2. <i>Genotyping and parental assignment</i>	102
V.3.2. <i>Statistical model</i>	102
V.4. <i>Results</i>	104
V.4.1. <i>Pedigree reconstruction</i>	104
V.4.2. <i>Growth and carcass traits</i>	104
V.4.2. <i>Heritabilities and correlations for growth and carcass traits</i>	105
V.4.3. <i>Cardio-respiratory traits</i>	109
V.5. <i>Discussion</i>	112
V.5.2. <i>Pedigree reconstruction</i>	112
V.5.3. <i>Phenotypic growth parameters</i>	112

V.5.2. Heritabilities and correlations	113
V.5.3. Cardio-respiratory heritabilities and correlations.....	116
V.6. Conclusion.....	117
V.7. Acknowledgement.....	117
VI. Estimates of genetic and phenotypic parameters for body composition and quality traits in meagre (<i>Argyrosomus regius</i>).....	121
VI.1. Abstract	121
VI.2. Introduction	123
VI.3. Materials and methods	124
VI.3.1. Breeding conditions.....	124
VI.3.2. Body composition and quality traits.....	125
VI.3.3. Genotyping and paternity.....	126
VI.3.4. 2.4. Data analysis	126
VI.4. Results	127
VI.4.1. Parental assignment	127
VI.4.2. Quality traits and phenotypic correlation	127
VI.4.2. Heritability and correlations	131
VI.5. Discussion	132
VI.5.1. Phenotypic quality traits.....	132
VI.5.2. Heritabilities and correlations	133
VI.6. Conclusion.....	136
VI.7. Acknowledgement.....	137
VII. CONCLUSIONES.....	141
VIII. Bibliografía	147
Anexos.....	183

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA I.1. FOTOGRAFÍA DE UN ESPÉCIMEN DE CORVINA DE CULTIVO.....	5
FIGURA I.2. REPRESENTACIÓN GRÁFICA DE LA PRODUCCIÓN MUNDIAL DE CORVINA.	10
FIGURA I.3. REPRESENTACIÓN GRÁFICA DE LA PRODUCCIÓN ESPAÑOLA DE CORVINA. (APROMAR, 2011).	11
FIGURA I.4. DISTRIBUCIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE CORVINA EN EL 2008 POR COMUNIDADES AUTÓNOMAS (APROMAR, 2009).	11
FIGURA II.1. PASSIVE INTEGRATED TRANSPONDER (PIT).....	26
FIGURA II.2. DISEÑO EXPERIMENTAL: EVALUACIÓN DEL ESTRÉS POR MARCAJE CON PASSIVE INTEGRATED TRANSPONDER (PIT)	29
FIGURA II.3. MUESTREOS MENSUALES Y FINAL DE CORVINA	33
FIGURA II.4. DISEÑO DEL EXPERIMENTO Y INSTALACIONES DE CULTIVOS, ICCM, CANEXMAR Y ADSA.	45
FIGURA II.5. MUESTREO PARA LOS CARACTERES DE LA CARCASA Y DE CALIDAD ANALIZADOS.	49
FIGURA II.6. DETALLES DE LOS PROTOCOLOS DE TRABAJO PARA LOS CARACTERES DE CALIDAD ANALIZADOS.	49
FIGURE III.1. CYP1A EXPRESSION EVALUATION FOR TAGGED AND UNTAGGED FISH AT 0H, 1D, 7D AFTER TAGGING.	63
FIGURE IV.1. EXAMPLE OF ELECTROPHEROGRAM FOR THE INTER-SPECIFIC MULTIPLEX PCR (STRI).	82
FIGURE IV.2. EXAMPLE OF ELECTROPHEROGRAM FOR THE SPECIFIC MULTIPLEX PCR (STRS).	82
FIGURE V.1. ANALYZED IMAGE TRAITS FOR MEAGRE (ARGYRO SOMUS REGIUS) TOTAL AREA (1), TOTAL LENGTH (2A), DORSAL LENGTH (2B), MAX DORSAL WIDTH (3A), MAX WIDTH (3B), FIN WIDTH (4), HEAD-FIN LENGTH (5), MAX HEAD WIDTH (6), AREA FILLET (7), STANDARD LENGTH (8), MAX FILLET LENGTH (9) AND DORSAL AREA (10).....	103

ÍNDICE DE TABLAS

TABLA II.1. NOMBRE DE LOCUS, MOTIVO DE REPETICIÓN (M), FLUOROCROMOS (F), FORWARD Y REVERSE SECUENCIAS DE LOS CEBADORES Y REFERENCIAS DE CADA UNO DE LOS MICROSATÉLITES SELECCIONADOS INICIALMENTE.	34
TABLA II.1. NOMBRE DE LOCUS, MOTIVO DE REPETICIÓN (M), FLUOROCROMOS (F), FORWARD Y REVERSE SECUENCIAS DE LOS CEBADORES Y REFERENCIAS DE CADA UNO DE LOS MICROSATÉLITES SELECCIONADOS INICIALMENTE (CONTINUACION).	35
TABLA II.1. NOMBRE DE LOCUS, MOTIVO DE REPETICIÓN (M), FLUOROCROMOS (F), FORWARD Y REVERSE SECUENCIAS DE LOS CEBADORES Y REFERENCIAS DE CADA UNO DE LOS MICROSATÉLITES SELECCIONADOS INICIALMENTE (CONTINUACION).	36
TABLA II.1. NOMBRE DE LOCUS, MOTIVO DE REPETICIÓN (M), FLUOROCROMOS (F), FORWARD Y REVERSE SECUENCIAS DE LOS CEBADORES Y REFERENCIAS DE CADA UNO DE LOS MICROSATÉLITES SELECCIONADOS INICIALMENTE (CONTINUACION).	37
TABLA II.2. NOMBRE DE LOCUS, FLOROCROMOS (F), FORWAD Y REVERSE SECUENCIAS DE LOS CEBADORES, CONCENTRACIONES DE LOS CEBADORES (Cp) (mM) EN LAS DOS PCR MULTIPLEX FINALES.	41
TABLA II.2. NOMBRE DE LOCUS, FLOROCROMOS (F), FORWAD Y REVERSE SECUENCIAS DE LOS CEBADORES, CONCENTRACIONES DE LOS CEBADORES (Cp) (mM) EN LAS DOS PCR MULTIPLEX FINALES (CONTINUACION).	42
TABLE III.1. SEQUENCE, TEMPERATURE ANNEALING (Tm), ACCESSION NUMBER, EXPECTED SIZE (Es) AND FINAL CONCENTRATION (Cf) IN RT REACTION SIZES OF AMPLICONS OF THE PRIMERS USED IN THIS STUDY.	60
TABLE III.2. BODY WEIGHT (W), LENGTH (L) AND MORTALITY (M) IN TAGGED AND UNTAGGED FISH AT 0, 15 AND 30 DAYS FOR 2, 3 AND 4 G. EXPERIMENT IN MEAGRE....	62
TABLE III.3. WOUND HEALING RATE IN TAGGED MEAGRE AT 2, 3 AND 4 G. WEIGHT CLASSES.	63
TABLE IV.1. BODY WEIGHT. NUMBER OF ALLELES (K), ALLELE SIZE RANGE IN BP (RANGE), OBSERVED (H _{OBS}), EXPECTED (H _{EXP}) HETEROZYGOSITY, EXCLUSION PROBABILITY (EP) AND HARDY-WEINBERG EQUILIBRIUM TEST (HW) IN STR _I AND STRs MULTIPLEX REACTIONS.	84

TABLE IV.1. BODY WEIGHT. NUMBER OF ALLELES (K), ALLELE SIZE RANGE IN BP (RANGE), OBSERVED (H_{OBS}), EXPECTED (H_{EXP}) HETEROZYGOSITY, EXCLUSION PROBABILITY (EP) AND HARDY-WEINBERG EQUILIBRIUM TEST (HW) IN STR _I AND STRS MULTIPLEX REACTIONS (CONTINUACION).	85
TABLE IV.2. WEIGHT, LENGTH AND CONDITION FACTOR (K) FOR MEAGRE AT 4 DIFFERENT AGES FOR MEAGRE.	86
TABLE V.3. HERITABILITIES (IN THE DIAGONAL, WITH \pm STANDARD ERROR) PHENOTYPIC CORRELATIONS (ABOVE THE DIAGONAL) AND GENETIC CORRELATIONS (IN ITALICS BELOW THE DIAGONAL, WITH \pm STANDARD ERROR) BETWEEN GROWTH AND IMAGE ANALYZED TRAITS FOR MEAGRE.	107
TABLE V.4. CARDIO-RESPIRATORY TRAITS (MEAN \pm STANDARD DEVIATION) IN THE THREE FACILITIES FOR ON-GROWING MEAGRE.....	110
TABLE V.5. HERITABILITIES (IN THE DIAGONAL, WITH \pm STANDARD ERROR) PHENOTYPIC CORRELATIONS (ABOVE THE DIAGONAL) AND GENETIC CORRELATIONS (IN ITALICS BELOW THE DIAGONAL, WITH \pm STANDARD ERROR) BETWEEN GROWTH AND CARDIO-RESPIRATORY TRAITS FOR MEAGRE.	111
TABLE VI.1. PHENOTYPIC RESULTS OF GROWTH AND QUALITY TRAITS (\pm TYPIC ERROR) OF MEAGRE IN THE THREE DIFFERENT FACILITIES.....	128
TABLE VI.2. HERITABILITIES (IN THE DIAGONAL, WITH \pm STANDARD ERROR) PHENOTYPIC CORRELATIONS (ABOVE THE DIAGONAL) AND GENETIC CORRELATIONS (IN ITALICS BELOW THE DIAGONAL, WITH \pm STANDARD ERROR) BETWEEN GROWTH TRAITS AND QUALITY FOR MEAGRE.	129



RESÚMENES

RESUMEN

En este trabajo, se realizó por primera vez en corvina (*Argyrosomus regius*) la estima de parámetros genéticos de caracteres de crecimiento, de rendimiento y de calidad del pez y de la carne bajo condiciones industriales. Para ello, se ha tenido que poner a punto tanto herramientas de marcaje físico individual (*Passive Integrated Transponder*–PIT) como genético (microsatélites mediante PCR multiplex), necesarios para el desarrollo de cualquier programa de selección futuro, trazando el bienestar de los peces a través de la expresión del gen CYP1A.

Las condiciones óptimas de marcaje con el sistema de marcaje físico PIT, se estudiaron en tres clases de peso diferentes (2-3 g, 3-4 g y 4-5 g). Los peces de cada clases de peso se criaron en tres tanques diferentes y los caracteres de crecimiento, mortalidad y tasa de pérdida se analizaron a los 15 y 30 días post marcaje. Los resultados mostraron la ausencia de efecto del marcaje sobre el crecimiento en las tres clases de peso estudiadas. A su vez la tasa de mortalidad ha puesto de manifiesto una tendencia a la baja, inversamente proporcional al tamaño de peso (12,2%, 16% y 5% para las clases de peces 2-3g, 3-4g y 4-5g, respectivamente). La tasa de pérdida ha sido nula en todas las clases de peso. Estos datos sugieren que la talla apropiada para el marcaje del PIT en corvina es a partir de los 4 g. La expresión del gen CYP1A en las tres clases de peso a las 0 horas, 1 día y 7 días post marcaje mostraron que no hubo diferencias significativas entre individuos control y marcados excepto para la clase de peso 2-3g confirmando las conclusiones anteriores.

Se desarrollaron dos PCR multiplex; una específica (STRs) y otra interespecífica (STRi) constituidas por 8 y 10 marcadores microsatélites, respectivamente. Las dos

multiplex mostraron que los reproductores del lote del Instituto Canario de Ciencias Marinas (ICCM) tienen una variabilidad genética baja, que se destaca por la baja media del número de alelos, la heterocigosidad observada y la alta coascendencia que existe entre los individuos del lote. Con esta baja variabilidad y alta consanguinidad de los reproductores se ha podido asignar el 82,8% de descendientes a una única pareja de padres con la formación de 59 familias y la contribución de 25 machos y 22 hembras. Usando los descendientes asignados a una pareja de padres y asignados a un único padre se ha podido utilizar una matriz de 1.070 peces en la estima de los parámetros genéticos.

Las heredabilidades de peso, longitud y compacidad observadas en los peces del ICCM a varias edades ha sido baja. A su vez las correlaciones fenotípicas de estos caracteres aumentaron entre edades cercanas. En el caso de las correlaciones genéticas, éstas fueron altas independientemente de las edades consideradas. Estos resultados sugieren que en corvina se pueden realizar programas de selección dirigidos a caracteres de crecimiento desde tallas pequeñas.

Usando los datos al sacrificio de las instalaciones de cultivo del ICCM, y las empresas ADSA y CANEXMAR, los caracteres de crecimiento mostraron unas heredabilidades más elevadas que cuando sólo fueron considerados los descendientes del ICCM, ya que aumentó el número de familias contributivas ($0,19 \pm 0,11$ por la longitud y $0,22 \pm 0,12$ para el peso). Tanto las correlaciones fenotípicas como las genéticas fueron muy altas entre peso y longitud, confirmando la teoría de que es suficiente el uso de sólo uno de estos dos caracteres en un esquema de selección genética dirigido al crecimiento. A su vez se ha detectado una alta correlación fenotípica entre los caracteres de crecimiento y los caracteres de rendimiento (peso filete y peso eviscerado). A estos resultados se unen las similares heredabilidades que hubo entre estos dos tipos de caracteres.

En este trabajo se utilizó por primera vez el análisis de imagen para la estima genética

de caracteres morfológicos en peces. Los resultados han mostrado unas correlaciones genéticas y fenotípicas altas entre los caracteres muestreados (peso, longitud, peso filete y peso eviscerado) y los caracteres analizados vía imagen (áreas totales, longitudes total y anchuras máxima del filete), con valores cercanos a 0,9 en la mayoría de los casos, confirmando que éstos constituyen una vía a través de la cual llevar a cabo la selección sin tener que realizar procesos tediosos de valoración y permitiendo disminuir el tiempo de muestreo y hacer los procesos más eficientes.

A su vez se estimaron las correlaciones genéticas y fenotípicas y las heredabilidades de caracteres cardio-respiratorios. Se ha detectado una relación muy estrecha entre los pesos del ventrículo y de las branquias entre sí, por una parte, y de estos dos con los caracteres de crecimiento por otra. Estos datos mostraron la alta relación fisiológica entre los diferentes órganos ligados al crecimiento y por tanto la no interacción entre ambos grupos de caracteres.

En cuanto a los caracteres de calidad se han observado heredabilidades bastantes bajas para la humedad, la ceniza, los lípidos y el colágeno (entre 0 y 0,08). Y una heredabilidad moderada para la grasa evisceral ($0,27 \pm 0,12$). La humedad, la ceniza y el colágeno mostraron relación genética negativa con lípidos, grasas y caracteres de crecimiento. Todos estos resultados ponen de relieve que es posible estimar parámetros genéticos en corvina criadas y engordadas bajo condiciones industriales, a efectos que las empresas puedan obtener un valor añadido adicional de su producción a través de la selección directa para caracteres de crecimiento y rendimiento e indirecta para caracteres calidad.

ABSTRACT

In this study, for the first time, research of genetic parameters were conducted to estimate growth, carcass and quality processing trait in meagre (*Argyrosomus regius*), under industrial conditions. Therefore, it is necessary implant physical and genetic (microsatellites by multiplex PCR) tools for the development of any selection program.

To establish the optimal conditions of the physical tagging system (PIT), we studied three different tagging sizes (2-3 g, 3-4 g 4-5 g). Fish for each size were reared in three different tanks. Growth, mortality and loss rates were analyzed after 15 and 30 days post tagging. The results showed no effect of tagging on growth in the three sizes studied. Although, the mortality rate has shown a downward trend inversely proportional to the size of fish (12.2%, 16% and 5% for fish classes 2-3g, 3-4g and 4-5g, respectively). The loss rate was null in all weight classes. These data suggest that the right size for tagging with PIT system in meagre is from 4 g. In order of optimized the fish welfare, molecular marker CYP 1A were assessed to evaluate the effect of this tagging system in fish welfare in the 3 weight classes at 0 hours, 1 day and 7 days post tagging. Data from this experiment showed that gene expression between controls and tagged fish is significant only for 2-3g tagged weight class. These data confirm previous suggestions.

The development of this type of physical tagging system was necessary to monitor and control fish throughout the growing period. However, it was necessary to develop genetic tools for the characterisation of the Instituto Canarias de Ciencias Marinas ICCM breeder stock and for the assignation of their descendants. That's why specific (STRs) and interspecific (STRi) multiplex PCR were developed. 8 and 10 microsatellite markers

formed STRs and STRi, respectively. Result of genetic parameter shown that the ICCM breeder have a low genetic variability, characterized by low alleles mean, low observed heterozygosity and high coancestry rate among breeders. In these conditions, STRs and STRi were able to assign 82.8% descendants to a single parent pair with the formation of 59 families and the contribution of 25 males and 22 females. Using the offspring assigned to parent pair and descendants assigned to a single parent, 1070 offspring were used in the estimation of fish genetic parameters.

Heritability of weight, length and condition factor for fish reared in the ICCM facility were low at 120, 150, 296 and 446 post hatching and ranged between 0.01 ± 0.07 and 0.19 ± 0.10 . Thus, the phenotypic correlations between these traits have increased with the closeness of ages. However, genetic correlations were very high between traits at any age. These results suggest that meagre can performed a selection program for growth traits from small sizes.

Using data at slaughtered age for the three facilities of the ICCM, CANEXMAR and ADSA, growth traits showed a bit higher heridabilities than the previous ones, but still low or moderate (0.19 ± 0.11 and 0.22 ± 0.12 , respectively for length and weight). Both genetics and phenotypic correlations were very high between weight and length, confirming that it is sufficient to use one of these two traits in a breeding scheme targeted to growth. At the same time, a high correlation between growth traits and carcass traits (fillet weight and gutted weight) were detected. These results with the similar heritabilities observed for carcass traits suggest the importance of these traits and the necessity of their introduction a selection breeding scheme.

In this study, image analysis technique was used for the first time to estimating genetic morphological traits in fish. The results have shown a high genetic and

phenotypic correlation between sampled traits (weight, length, fillet weight and gutted weight) and the image analyzed traits (Total areas, Total lengths and Max widths), which may be a new strategy for selection breeding scheme to allow the hard and invasive traditional sampling technique.

Respect to heritabilities and correlations of cardio respiratory traits, close relationship between ventricular and gills weights were detected. The same high correlation was observed between these two traits and growth one. These data showed a high physiological relationship between organs linked directly and indirectly to growth and open other ways in the integration of new traits in the selection scheme.

Genetic variation for quality traits showed quite low heritabilities for moisture, ash, lipids and collagen and ranged between (0 to 0,08). Unlike, moderate heritabilities were observed for visceral fat weight and percentage (0.27 ± 0.12). Although, these correlations evidence the existence of two groups inversely correlated. Moisture, ash and collagen are inversely correlated with lipids, fats and growth traits. These correlations suggest taking into account the physiological characteristics of meagre to allow problem in the stability of the final product and consequently, its commercial value and detrimental effects of fish health and biological efficiency.

RÉSUMÉ

Dans ce travail, pour la première fois une étude des paramètres génétiques pour le maigre (*Argyrosomus regius*) était menée pour estimer les caractères de croissance, de carcasse et de qualité du poisson dans des conditions industrielles. Pour l'élaboration de ce type de programme de sélection, il a été nécessaire de mettre en place des outils de marquages physiques (Passif Intégré Transpondeur, PIT) et génétiques (microsatellites et PCR multiples).

Afin de déterminer les conditions optimales de marquage avec le système physique (PIT), nous avons étudié trois différentes tailles de marquages (2-3 g, 3-4 g et 4-5 g). Pour chaque taille de marquage, les poissons ont été répartis dans trois bassins différents et les effets sur la croissance, la mortalité et le taux de perte ont été analysés après 15 et 30 jours après le marquage. Les résultats n'ont montré aucun effet du marquage sur la croissance dans les trois tailles étudiées. À son tour, le taux de mortalité a montré une tendance à la baisse inversement proportionnelle à la taille des poissons (12.2%, 16% et 5% pour les classes de poisson 2-3g, 3-4g et 4-5g, respectivement). Le taux de perte était nul dans toutes les catégories de poids. Ces données suggèrent que la bonne taille pour le marquage avec le système PIT est de 4 g. Aussi, et en optant pour le bien-être des poissons, ce genre de manipulation a été évalué utilisant un marqueur moléculaire CYP 1A dans les 3 catégories de poids à 0 heure, 1 jour et 7 jours après le marquage. Les données de cette expérience ont montré que l'expression du gène entre les poissons contrôles et les marqués n'est significative que pour la catégorie de poids 2-3g. Ces données confirment les suggestions précédentes.

Le développement de ce type de marquage physique était nécessaire pour surveiller et contrôler les poissons tout au long de son élevage. En plus il a été nécessaire de développer des outils génétiques pour la caractérisation du lot des reproducteurs de l'ICCM et pour l'assignation de chaque descendant à une paire de parents. Par conséquent, deux PCR multiples spécifique (SRTs) et interspécifique (STRi) ont été développés et composés de 8 et 10 marqueurs microsatellites, respectivement. Les résultats des deux PCR multiples dans le lot des reproducteurs de l'ICCM ont montrés une faible variabilité génétique qui se caractérise par un faible numéro d'allèles, une faible hétérozygoté observée et une coancestralité très élevée entre les individus du lot. Avec cette faible variabilité et la haute consanguinité 82.8% ont été assignés à une seule paire de parent, avec la formation de 59 familles et la contribution de 25 mâles et 22 femelles. En utilisant la progéniture attribuée à un couple de parents et ceux qui ont été assignés à seulement un père, on a pu utiliser 1070 poissons pour l'estimation des paramètres génétiques.

La héritabilité des caractères de poids, longueur et la compacité des poissons observés a été faible à différents âges dans le lot de l'ICCM. À leur tour, les corrélations phénotypiques de ces caractères ont augmenté avec la proximité des âges. Même dans le cas de la corrélation génétique les corrélations étaient très élevées indépendamment de l'âge. Ces résultats suggèrent que un programme de sélection génétique en maigre peu se réaliser dès un âge précoce pour les caractères de croissance.

En utilisant les données, à date de sacrifice, des installations de l'ICCM, ADSA et CANEXMAR, les caractères de croissance ont montré des héritabilités un peu plus élevés que les précédentes, mais restent généralement faibles à modérés. Cela n'empêche que la corrélation génétique et phénotypique ont été très élevées entre le poids et la longueur, ce

qui confirme la théorie selon laquelle il suffit d'utiliser un de ces deux caractères dans un schéma de sélection visant la croissance. En même temps une forte corrélation a été détecté entre les caractères de croissance et la carcasse (poids du filet, le poids viscéral). Ces résultats, en plus, de la héritabilité similaire que existe entre ces caractères confirme l'utilité de l'estimation des caractères de carcasse lors d'élaborer un programme de sélection.

Dans ce travail, la technique d'analyse d'image a été mis au point pour la premier fois pour la estimation génétique des caractères morphologiques chez les poissons. Les résultats ont montré une forte corrélation phénotypique et génétique entre les caractères de échantillonnages (poids, longueur, le poids de filet et poids éviscéré) et les caractères à travers l'image analysée (surfaces, longueurs et largeurs), qui peut être une nouvelle stratégie lors de la conception du programme de sélection permettant l'utilisation d'une technologie qui nous permet de gagner du temps dans l'échantillonnage avec la même efficacité.

Aussi, les caractères cardiorespiratoires ont montré une relation étroite entre le poids du ventricule et des branchies d'une part et entre ces deux caractères avec ceux de la croissance. Ces données ont montré une haute corrélation physiologique entre les différents organes liés à la croissance et ouvre de nouvelles expectatives dans l'intégration de nouveaux caractères dans le schéma de sélection.

En plus, les caractères de qualité ont montré une héritabilité assez faible pour la humidité, cendres, lipides et le collagène. Et une héritabilité modérée pour la graisse viscérale. Bien que les corrélations montrent l'existence de deux pôles opposés inversement corrélés entre eux. L'humidité, cendres et le collagène sont inversement corrélés avec les lipides, les graisses et les caractères de croissance. Ces corrélations

suggèrent de prendre en compte les caractéristiques physiologiques de maigres pour éliminer les problèmes dans la stabilité du produit final et, par conséquent, sa valeur commerciale et des effets néfastes de la santé des poissons et l'efficacité biologique.



INTRODUCCIÓN



I. Introducción

I.1. Acuicultura mundial

En un contexto mundial caracterizado por la fuerte disminución en la producción de la pesca, frente a un aumento constante de la población y la demanda de productos provenientes del mar, la acuicultura se está consolidando como una alternativa prometedora que podría cerrar la brecha entre la oferta y la demanda mundial de pescado. Este sector es el que más crece dentro de los sectores alimenticios y está en camino de superar a la pesca extractiva, como principal fuente de pescado para el consumo humano (FAO, 2010).

Aunque la acuicultura se ha practicado durante muchos siglos en algunos países, sigue siendo, en el contexto global, un sector joven en la producción de alimentos, que ha crecido rápidamente en los últimos 50 años. La producción mundial de la acuicultura se ha expandido significativamente, desde menos de 1 millón de toneladas en 1950 hasta 52,5 millones de toneladas en 2008, un aumento tres veces más rápido que la producción mundial de carne en el mismo período.

Así, durante esta última década del siglo XXI, se ha visto un aumento importante de la producción acuícola frente a la de captura, con más de la mitad del conjunto de los productos acuáticos consumidos actualmente por la población mundial procedente de granjas acuícolas (APROMAR, 2011). Sin embargo, la tasa de crecimiento de la producción acuícola se está desacelerando bajo el impacto de diversos factores. Desde el año 2000, el crecimiento medio anual en la producción acuícola ha sufrido un importante descenso en Europa y América del Norte, alcanzando respectivamente el 1,7 y el 1,2 por ciento. La producción cayó en la última década en los países que fueron vanguardistas en el desarrollo de la acuicultura, como España, Francia y Japón.



INTRODUCCIÓN

No obstante, aunque la mejora anual en producción no es muy importante, se ha producido una mejora debida al desarrollo de nuevas tecnologías de cultivo y al conocimiento de la biología de las nuevas especies integradas dentro de los productos de cultivo (Fotedar y Phillips, 2011). En el año 2009, se estaban produciendo en el mundo 450 especies diferentes pertenecientes a los grupos de peces, moluscos, crustáceos, algas y otros. De éstos, se pueden destacar más de 274 de especies de plantas y animales acuáticos producidos en cantidades significativas (más de 100 toneladas). Esta diversidad se debe al elevado número de organismos acuáticos que pueden adaptarse a los sistemas y condiciones de producción controlada.

En los países europeos, el cultivo marino de peces se limita a 5 - 6 especies que representan más del 90 % de la producción. En el mar Mediterráneo, la producción acuícola marina está limitada a tres especies: la dorada (*Sparus aurata*) con 96.419 toneladas, la lubina (*Dicentrarchus labrax*) con 57.004 toneladas y el rodaballo (*Psetta maxima*) 9.168 toneladas (APROMAR, 2011).

La introducción de nuevas especies en el mercado Europeo y Mediterráneo servirá para la diversificación de la producción acuícola, además de para expandir y ampliar los mercados existentes, reduciendo el riesgo de la fluctuación de los ingresos y aumentando la eficiencia de uso de los recursos existentes (CIHEAM, 1999). Aunque el interés de introducir nuevas especies está probado y más de 20 nuevas especies con un importante valor económico y con un perfil prometedor han sido y están siendo estudiadas a nivel de investigación (Barbato y Corbri, 1995; Kentouri *et al.*, 1995; Lensi, 1995; Kožul *et al.*, 2001; Roo *et al.*, 2010), la introducción a nivel industrial está siendo lenta y poco efectiva. Así, podemos nombrar como especies introducidas con éxito recientemente a nivel industrial, el sargo picudo (*Puntazzo puntazzo*) o la corvina (*Argyrosomus regius*).



I.2. La corvina: Características morfológicas

La corvina, *Argyrosomus regius* (Asso, 1801), es una especie de agua marina perteneciente a la familia de los Scianidos. Se caracteriza morfológicamente por una cabeza relativamente grande y un cuerpo alargado, una boca en posición terminal sin barbillas, dos ojos bastante pequeños, una línea lateral evidente que se extiende sobre la aleta caudal. Posee una segunda aleta dorsal mucho más larga que la primera. La aleta anal tiene un primer radio espinoso corto y un segundo muy delgado. Varios apéndices ramificados están presentes en la vejiga natatoria, que pueden vibrar produciendo un sonido típico conocido como 'ronquido' (Duhamel de Monceau, 1777; Dufosse, 1874). Además, se caracteriza por dos otolitos muy grandes, un color de cuerpo gris-plateado, con tintes bronceados dorsalmente, la base de las aletas café rojiza y la cavidad de la boca amarillo dorada y un color post mortem café (Figura I.1).



Figura I.1. Fotografía de un espécimen de corvina de cultivo.



I.3. Distribución geográfica

La corvina se distribuye ampliamente por todo el Mar Mediterráneo, aunque no es muy habitual en las costas de Italia y Grecia. Es una especie común en el Atlántico desde las Costas noruegas por el norte hasta las Costas del Congo por el sur (Chao, 1986), y según Quéro y Vayne (1987), se encuentra en el Atlántico desde Islandia hasta el Golfo de Guinea. Los peces más grandes se encuentran a lo largo de la Costa oeste de África, donde grandes cardúmenes de corvina se encuentran alrededor de buques desechados en los que crean su hábitat varias especies comerciales. También se encuentra en la parte occidental del Mar Negro, en el Mar de Marmara, y en el Mar Rojo desde el Canal de Suez hasta el Océano Índico (Quéro, 1989).

Al ser la corvina una especie semi-pelágica costera, con tendencia demersal (Quéro y Vayne, 1987), puede crecer hasta los 2 metros y alcanzar más de 50 kg. El crecimiento se logra principalmente durante el verano, ya que la actividad de alimentación se reduce substancialmente cuando las temperaturas del mar caen por debajo de 13-15°C (FAO, 2012).

I.4. Reproducción y biología de la especie

Durante la migración reproductiva a mediados de abril, las corvinas adultas se aproximan a la costa y éstas penetran en los estuarios a finales de mayo para desovar (migración anádroma) (Quémèner, 2002). Durante la estación de desove, los machos producen un sonido profundo típico, empujando sus músculos abdominales contra la vejiga natatoria. Desde mediados de junio hasta fines de julio abandonan los estuarios para alimentarse a lo largo de la costa. Ellas permanecen en aguas poco profundas hasta el comienzo del otoño. Durante el invierno, las corvinas retornan a aguas profundas.



1.5. Historia y situación actual de la acuicultura

La corvina, como otros miembros de la familia *Scianidae* es en este momento objeto de interés internacional de cara a su cría comercial, ya que presenta unas características biológicas excelentes permitiendo considerarla como una magnífica candidata para la diversificación productiva en acuicultura marina. Es una especie altamente fecunda, ampliamente distribuida, con unos precios de mercado medio-altos y con buena aceptación por parte de los consumidores (Jiménez *et al.*, 2005). Además, presenta la ventaja añadida de que se trata de una especie eurihalina, con un amplio rango de tolerancia de salinidad, lo que permite su adaptación a ambientes muy diversos, incluso a la cría terrestre en aguas salobres. También tolera perfectamente la cautividad, como demuestra su presencia en grandes acuarios, y presenta unas elevadas tasas de crecimiento en engorde y unos buenos índices de conversión (Calderón *et al.*, 1997; Pastor *et al.*, 2002). Sus características organolépticas demuestran que las corvinas de engorde presentan unas cantidades inusualmente bajas de grasa mesentérica y muscular, en comparación con otras especies de granja, y un período de conservación largo en condiciones de refrigeración, características que permiten considerar a la corvina de granja como un producto de excelente calidad (Poli *et al.*, 2003).

La historia de la acuicultura de la corvina es bastante reciente. Los primeros ensayos con reproductores silvestres fueron conducidos en el sur de Francia, donde se pensó que algunos peces de la familia *Scianidae* tenían buen potencial para acuicultura. Comenzando en 1996, la producción de alevines ha sido muy limitada, con un solo criadero operando en Francia. La primera producción comercial en Francia fue registrada en 1997. Desde entonces, la producción se ha expandido lentamente a las regiones cercanas, especialmente en Italia, España, Egipto y otros países del Mediterráneo, lo que



INTRODUCCIÓN

ha promovido su producción de alevines así como la investigación. La posible contribución a la diversificación de las especies actualmente producidas en el Mediterráneo, evitando con ello el estancamiento de las empresas del sector, hace que esté considerada como especie prioritaria a nivel europeo en los programas nacionales de investigación y desarrollo de los países mediterráneos (Mateos, 2007).

En España, la Junta Nacional Asesora de Cultivos Marinos (JACUMAR), órgano constituido por el Ministerio de Medio Ambiente, Medio Rural y Marino, a través de su Secretaria General de Pesca unido a los Organismos Gestores de las CC. AA. y las asociaciones representantes del sector productivo acuícola, ha considerado esta especie como prioritaria y esta incluida en el Plan Nacional de Cultivos Marinos, siendo estudiada actualmente en diferentes centros de investigación con el objetivo de optimizar su cultivo.

Así en la fase de estabulación y puesta de reproductores, la primera referencia fue de Calderón *et al.* (1997), realizándose con posterioridad la estabulación de 361 reproductores divididos en tres centros de investigación españoles como desarrollo del proyecto planes de cultivos marinos en la cría de corvina (PLANCOR) (Cárdenas, 2010). Uno de los tres centros anteriormente citados es el Instituto Canario de Ciencias Marinas (ICCM), del que se ha descrito la evolución de maduración de su stock de reproductores (Schuchardt *et al.*, 2007). Así mismo, durante el desarrollo del citado proyecto se han obtenido las primeras puestas inducidas mediante tratamiento hormonal en España (Grau *et al.*, 2007), manipulación que ha sido afinada y correlacionada con la calidad de la puesta (Duncan *et al.*, 2008, Fernández-Palacios *et al.*, 2009b).

En cuanto a la cría larvaria de corvina se han realizado varios estudios del desarrollo morfológico y fisiológico de la especie (Jiménez *et al.*, 2005; Cruz *et al.*, 2007; Gamsliz y Neke, 2008; Abreu *et al.*, 2009; Fernández-Palacios *et al.*, 2009a), así como estudios



nutricionales (Hernández-Cruz *et al.*, 2007; Fernández-Palacios *et al.*, 2009a). Sin embargo, el primer protocolo de alimentación larvaria a escala industrial fue publicado por Roo *et al.* (2010) en cuyo estudio se probaron 3 sistemas diferentes de cultivo larvario basado en alternancia de alimento vivo e inerte.

Varios estudios se han realizado también en el pre-engorde y el engorde de corvina, tratando de analizar la cría en varias salinidades (Tinoco *et al.*, 2009), en varias temperaturas (Lavié *et al.*, 2008), en diferentes tipos de instalaciones (Jiménez *et al.*, 2005), con alimentación en la que se valoraban diferentes niveles de lípidos (Chatzifotis *et al.*, 2010), y también la valoración de varias concentraciones de proteínas de origen vegetal en el crecimiento de la corvina (Estévez *et al.*, 2011).

1.6. Producción mundial y situación del mercado

La producción mundial de corvina fue nula hasta el año 1997, fecha en la cual se declararon 30 toneladas en la primera producción. Durante los siguientes 5 años la producción mundial de corvina se quedó estable en 30 toneladas, y desde el año 2003 se ha observado un aumento acelerado hasta el 2010 alcanzando una producción de 3.855 toneladas (Figura I.2). Esta producción estaba hasta hace escasos años limitada al sur de Francia e Italia proviniendo el 90% del cultivo de jaulas marinas. Sin embargo, estos últimos años se ha visto aumentada la producción por la entrada de España y Egipto en la producción (FAO, 2010).

Atendiendo a los datos de la Federación Europea de los Productores en Acuicultura (FEAP), la producción de corvina en Europa en 2010 ascendió a 3.855 toneladas, un 77,7% más que en 2009, cuando se produjeron 2.178 toneladas. El primer país productor



INTRODUCCIÓN

de corvina de acuicultura en Europa en 2010 fue España con 3.250 toneladas lo cual representa el 84,3% del total de la producción Europea (APROMAR, 2011). (Figura I.3).

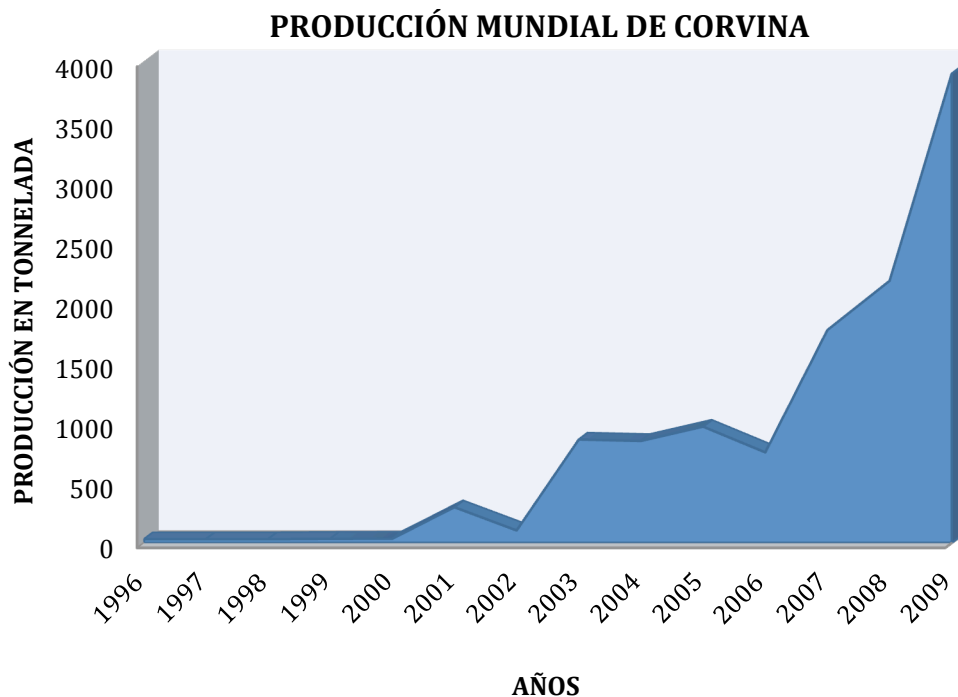


Figura I.2. Representación gráfica de la producción mundial de corvina.

En España la producción de corvina está creciendo a un ritmo frenético, duplicándose de un año a otro. Así, la producción del 2010 aumentó el 96% con respecto a la producción del año anterior. Por comunidades autónomas, la primera en producción fue Cataluña en el año 2004 con 10 toneladas y la Comunidad Valenciana con una tonelada. En el 2010, la mayor producción la generó Murcia con el 56 %, seguida por las otras comunidades autónomas productoras (Figura I.4).

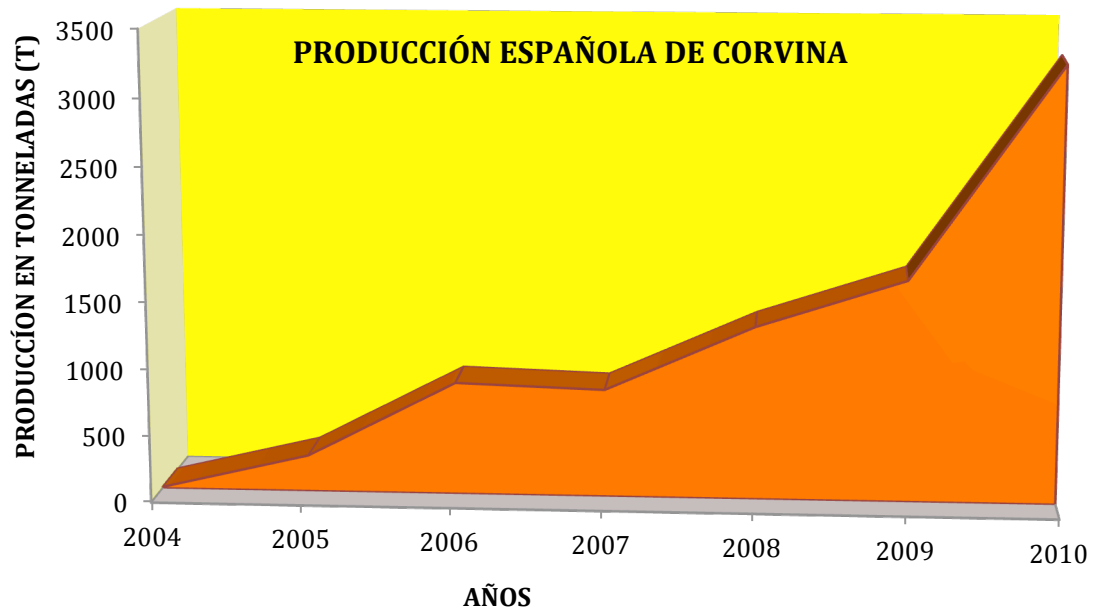


Figura I.3. Representación gráfica de la producción española de corvina.

(APROMAR, 2011).

PRODUCCIÓN DE CORVINA POR COMUNIDAD

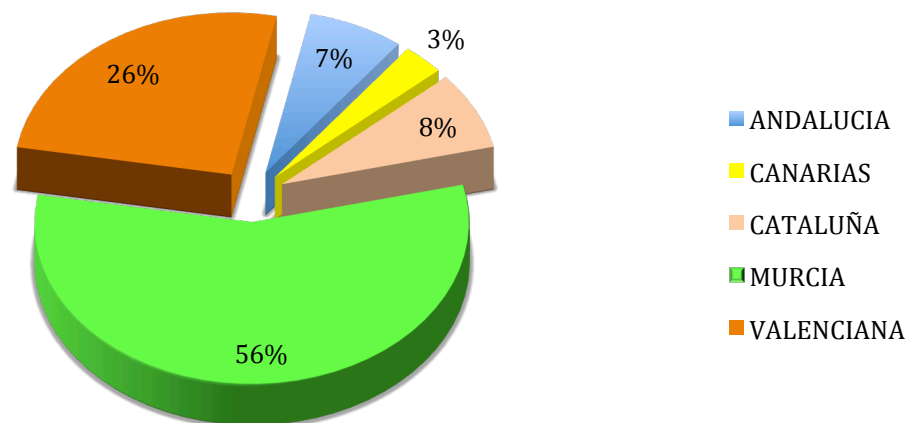


Figura I.4. Distribución de la producción de corvina en el 2008 por comunidades

autónomas (APROMAR, 2009).



En Canarias la primera producción fue en 2006 con una producción del 75 toneladas, mientras que en el 2008 su producción fue de 250 toneladas representando el 19,2% de la producción española en esa anualidad (APROMAR, 2009), sin embargo en los dos últimos años la producción ha sido nula (APROMAR, 2011).

I.7. Justificación

En un mundo donde la economía es frágil, e inmersos en una crisis que está afectando a todos los sectores, la continuidad de una empresa acuícola sigue teniendo como objetivo el conseguir la máxima rentabilidad económica. Por una parte, optando por un rápido crecimiento con los mínimos gastos posibles, y de otra parte satisfaciendo la demanda del consumidor, para lo que la obtención de un producto comercializable sin deformidades, de morfología aceptable y color atractivo o igual al pez salvaje. Al mismo tiempo el consumidor es más exigente a la hora de elegir los productos, lo que incluye dentro de las necesidades de las empresas acuícolas el tener un producto con una mayor calidad y una mayor accesibilidad para el consumidor. Todo ello representa un reto más para la mejora de ciertas condiciones de cultivo. Sobre todo en una especie emergente como la corvina, que tiene un gran potencial y donde el campo de mejora es todavía muy amplio en todos los ámbitos: nutrición, manejo, protocolo de cultivo, reproducción y genética, siendo este último sin duda, uno de los sectores que promete mayor margen de respuesta.

En este sentido, algunos experimentos en relación a los distintos campos susceptibles de mejora han sido abordados como son las condiciones de cultivo, el manejo reproductivo o la nutrición, con un grado de desarrollo aceptable (Poli *et al.*, 2003; Jiménez *et al.*, 2005; Hernández *et al.*, 2009; Tinoco *et al.*, 2009; Chatzifotis *et al.*, 2010; Estévez *et al.*, 2011; Grikorakis *et al.*, 2011; Roo *et al.*, 2010; Serezli *et al.*, 2011). En el ámbito de la genética, tan sólo se han realizado algunos estudios de variabilidad genética



(Fasano *et al.*, 2006), además de la publicación en la base de datos del Centro Nacional de Información Biotecnológica NCBI de algunos marcadores moleculares (Porta *et al.*, 2010) que están resultando muy útiles para el control, seguimiento y mejora de los stocks de reproductores salvajes y cultivados de Italia y España.

El objetivo principal de la genética aplicada consiste en el desarrollo de programas de mejora con el fin de determinar qué animales pueden utilizar de una manera más eficiente los recursos disponibles, y dónde es muy probable que al lograr este objetivo también se seleccionarán los animales que se adaptan mejor al medio en cautividad, ya que deben crecer mejor en estas condiciones (Gjedrem, 2005). En la acuicultura, los programas de selección no son comúnmente utilizados por las empresas, y muchas de ellas confían todavía la producción de especies a la captura de reproductores silvestres y / o larvas. Por ello, son escasos los programas de selección genética desarrollados respecto a la cantidad de peces producidos. A título indicativo 62 programas se están desarrollando en peces y mariscos, la mayoría de ellos se han realizado en salmónidos (Rye *et al.*, 2010).

Unas de las razones de la escasez de programas de mejora genética en acuicultura se debe a que los ciclos reproductivos en muchas de las especies son a menudo complejos, la domesticación de los peces es bastante lenta y la realización de un esquema de selección requiere del control de estos dos aspectos (Gjedrem y Baranski, 2008). Hasta ahora, no ha existido un gran interés en el desarrollo de programas de mejora genética en la acuicultura, siendo la información sobre parámetros fenotípicos y genéticos de interés económico muy limitada o inexistente en la mayoría de las especies cultivadas.

En acuicultura la implantación de un esquema de selección suele comenzar con la optimización de caracteres de crecimiento como el peso, la longitud y la tasa de crecimiento. La variación de cada uno de estos caracteres, condiciona la rapidez de lograr



INTRODUCCIÓN

un producto comercializable en un tiempo óptimo, lo cual incidirá en un menor gasto en alimentación por una mejor tasa de conversión. Las primeras estimas sobre parámetros genéticos en especies acuáticas comenzaron en los años 70, entre ellas las heredabilidades para el peso y la longitud de trucha arcoiris (*Oncorhynchus mykiss*) (Aulstad *et al.*, 1972), y para el peso en carpa común (*Cyprinus carpio*) (Kirpichnikov, 1972). Así, se han realizado varios estudios para estimar parámetros genéticos en caracteres de crecimiento en algunas especies de interés comercial como, rodaballo (*Scophthalmus maximus*) (Gjerde *et al.*, 1997), bacalao (*Gadus morhua*) (Gjerde *et al.*, 2004; Kolstad *et al.*, 2006), en dorada (*Sparus aurata*) (Knibb *et al.*, 1997; Navarro *et al.*, 2009a), lubina (*Dicentrarchus labrax*) (Dupont-Nivet *et al.*, 2008) y en European Whitefish o lavareto (*Coregonus lavaretus*) (Kause *et al.*, 2007, 2011).

El interés económico de estos caracteres de crecimiento se ha visto confirmado positivamente en el Programa Nacional de Selección del Salmón del Atlántico (Noruega), en el cual durante dos generaciones de selección solamente se incluyeron estos caracteres (Gjedrem, 2000).

Hasta hace poco tiempo, la estima de los parámetros genéticos estaba limitada a estos caracteres de crecimiento. Sin embargo, con el cambio del perfil del consumidor y la demanda del mercado, la estrategia de selección ha incluido otros aspectos de conformación y/o cualitativos, apareciendo con ello el interés en conocer cuáles son los parámetros genéticos de caracteres de calidad del pez y de composición de la canal y la carne.

El peso y el porcentaje del filete han sido de los caracteres de la canal más estudiados, sobre todo por especies destinadas al mercado de fileteo o incluso en aquellas en las que potencialmente podrían destinarse al mismo, tales como la tilapia del Nilo (Rutten *et al.*,



2005; Nguyen *et al.*, 2010), el salmón del Atlántico (Powell *et al.*, 2008), la trucha arcoiris (Kause *et al.*, 2007), la carpa común (Kocour *et al.*, 2007) y la dorada (Navarro *et al.*, 2009a).

Otros caracteres ligados directamente al peso eviscerado tales como el peso canal, el porcentaje canal y la grasa visceral han sido introducidos dentro de programas de selección genética en peces, debido al interés económico que puede suponer el peso útil del pescado (Elvingson y Nilsson, 1993; Kause *et al.*, 2002; Kause *et al.*, 2007; Vieira *et al.*, 2007; Powell *et al.*, 2008; Navarro *et al.*, 2009b; Kause *et al.*, 2011).

A su vez, el valor nutricional del pescado se caracteriza por su contenido en humedad, materia seca, proteína, lípidos, vitaminas y minerales, más el valor calórico de los mismos (Evangelos *et al.*, 1989). Se trata de caracteres importantes para el consumidor que han sido estudiados ampliamente desde el aspecto bioquímico en la mayoría de peces de cultivo. Sin embargo, los estudios de estimación de parámetros genéticos para la mayoría de estos caracteres son escasos (Navarro *et al.*, 2009b), excepto en el caso de los lípidos donde han sido publicadas varias estimas (Gjerde y Schaeffer, 1989; Rye y Refstie, 1995; Quinton *et al.*, 2005; Vieira *et al.*, 2007; Powell *et al.*, 2008; Navarro *et al.*, 2009b).

Así mismo, la calidad organoléptica del pescado resulta imprescindible en la evaluación de la calidad del mismo, a través de atributos como son el sabor, la jugosidad, la textura y la apariencia. Las estimas genéticas de estos caracteres son escasas y se suelen limitar a las heredabilidades del color o luminosidad del filete como las realizadas por Gjerde y Schaeffer (1989), Powell *et al.* (2008), Vieira *et al.* (2007), en salmón Atlántico, o de la textura estimada mediante medida indirecta basada en la concentración de colágeno en el músculo de dorada (Navarro *et al.*, 2009b).



INTRODUCCIÓN

En corvina no existe ninguna publicación de estimas de parámetros genéticos como la heredabilidad o las correlaciones genéticas. Sin embargo, sí se han desarrollado trabajos dirigidos al estudio de la calidad del pez abordando caracteres de crecimiento y de calidad desde el punto de vista fenotípico, así como estudios comparativos de la corvina con otras especie de cultivo como la dorada y la lubina (Poli *et al.*, 1999, 2001; Lanari *et al.*, 1999), basados en caracteres de calidad, donde se concluye que se trata de una especie muy diferente de las otras especies de acuicultura. Dicha diferencia parece muy clara cuando se comparan la corvina y la lubina del mismo tamaño comercial, observando un 88% menos de grasa abdominal y 83% menos de grasa intramuscular en corvina; esto puede ser explicado, según Poli *et al.* (2003), por un uso diferente de la dieta, situando a la corvina más cerca del pez gato salvaje. Para Bykov (2000), la corvina tiene una posición intermedia respecto a su composición corporal dentro de las especies acuícolas de mayor relevancia como la dorada y la lubina. También, el análisis sensorial pone de relieve el mantenimiento del 94% del perfil corporal del pez y el 44% del rendimiento filete en corvina sin ninguna influencia del rango de peso (Poli *et al.*, 2003; Grikorakis *et al.*, 2011).

Por otro lado, para establecer un programa de selección genética que aborde tanto caracteres de crecimiento como caracteres de calidad de los peces, se requiere del conocimiento de la genealogía de la descendencia. Sin embargo, en la mayoría de los casos este conocimiento no es posible por la técnica empleada en la obtención de huevos a escala industrial y que suele realizarse mediante puesta masal, la cual es la estrategia más extendida para garantizar los costes de producción en las empresas de cultivo y las necesidades de mercado. Desde el punto de vista genético, esta estrategia presenta la ventaja de que minimiza las fuentes de parecido por ambiente común entre los miembros



de la misma familia (Herbinger *et al.*, 1999), lo que proporciona una mayor exactitud de las estimas. Sin embargo, tiene el inconveniente de que imposibilita conocer la genealogía de los peces, que es un requisito indispensable para estimar parámetros genéticos. Bajo estas circunstancias, la trazabilidad de la genealogía a lo largo del desarrollo se puede realizar mediante la utilización conjunta del marcaje individual de los peces con sistemas físicos de marcaje como el Passive Integrated Transponder (PIT) y del análisis de un panel de marcadores moleculares como pueden ser los microsatélites.

El PIT tiene la ventaja de ser un marcador de uso práctico, manejable, automatizable, con un amplio margen de códigos numéricos y que ofrece gran seguridad a la hora de marcar los peces respecto a supervivencia y crecimiento de los peces, y alta tasa de retención de la marca inclusive en tallas pequeñas (Navarro *et al.*, 2006; Soula *et al.*, 2012). Este marcaje, se ha empleado en la gestión de stocks en acuicultura, donde la mayoría de los trabajos están orientados a contrastar el efecto de esta técnica de marcaje sobre el crecimiento y la supervivencia de los peces (Prentice *et al.*, 1990; Baras *et al.*, 1999, 2000; Navarro *et al.*, 2006; Soula *et al.*, 2012). Puesto que cada especie tiene diferentes grados de aceptación de los PITs debido a sus condicionantes biológicos, es difícil la interpolación entre especies. Así, el sistema PIT ha sido utilizado en un gran número de peces y crustáceos como son los salmónidos (Gries y Letcher, 2002; Dare 2003; Sigourney y Horton, 2005; Acolas *et al.*, 2007; Dieterman y Hoxmeier, 2009), la perca (Baras *et al.*, 2000), la tilapia (Baras *et al.*, 1999), el labeo roho o carpa hindú (Mahapatra *et al.*, 2001; Bolland *et al.*, 2009), el cavilat (Bruyndoncx *et al.*, 2002; Knaepkens *et al.*, 2007), el pargo (Quartararo y Bell, 1992), la dorada (Navarro *et al.*, 2006) y el bocinegro (Soula *et al.*, 2012).



INTRODUCCIÓN

En cuanto a los marcadores moleculares, los microsatélites se han convertido en unos de los más utilizados para una amplia variedad de estudios genéticos (Liu y Cordes, 2004). Se ha desarrollado un gran número de microsatélites en varias especies acuícolas (Herbinger *et al.*, 1999; Batargias *et al.*, 1999; Pérez-Enríquez *et al.*, 1999; Delghandi *et al.*, 2003; Jackson *et al.*, 2003; McDonald *et al.*, 2004; Sekino *et al.*, 2004; Chistiakov *et al.*, 2005; Yutao *et al.*, 2007; Navarro *et al.*, 2008; Gheyas *et al.*, 2009; Borrell *et al.*, 2011).

En la familia de los Scianidos, ha sido descrito un número significativo de microsatélites. En el corvinón ocelado (*Sciaenops ocellatus*) se han descrito 100, 38 y 30 microsatélites por Karlsson *et al.* (2008), O'Malley *et al.* (2003) y Turner *et al.* (1998), respectivamente. En la corvina japonesa (*Pseudosciaena crocea*) 36 microsatélites fueron publicados por Ning *et al.* (2007) y 11 por Chang *et al.* (2008). En la corvinata amarilla (*Cynoscion acoupa*) se han caracterizado 17 microsatélites (Farias *et al.*, 2006). En mulloway (*Argyrosomus japonicus*) han sido descritos 15 marcadores microsatélites (Archangi *et al.*, 2009). En *Argyrosomus regius*, recientemente han sido publicados en la base de datos del NCBI 23 marcadores microsatélites (Porta *et al.*, 2010), lo que permite disponer de un número suficiente de microsatélites para inferir con éxito la genealogía.

Sin embargo, el elevado número de microsatélites necesarios para inferir la genealogía de una población o conocer la diversidad genética de la misma aumenta los costes de la aplicación de la técnica (Liu y Cordes, 2004). Un método comúnmente utilizado para reducir costos y maximizar la eficiencia de la amplificación de microsatélites es la técnica de PCR Multiplex (Olsen *et al.*, 1996; Neff *et al.*, 2000; Wesmajervi *et al.*, 2006; Navarro *et al.*, 2008). Que consiste en la co-amplificación de múltiples marcadores de microsatélites en una sola reacción.



1.8. Objetivos

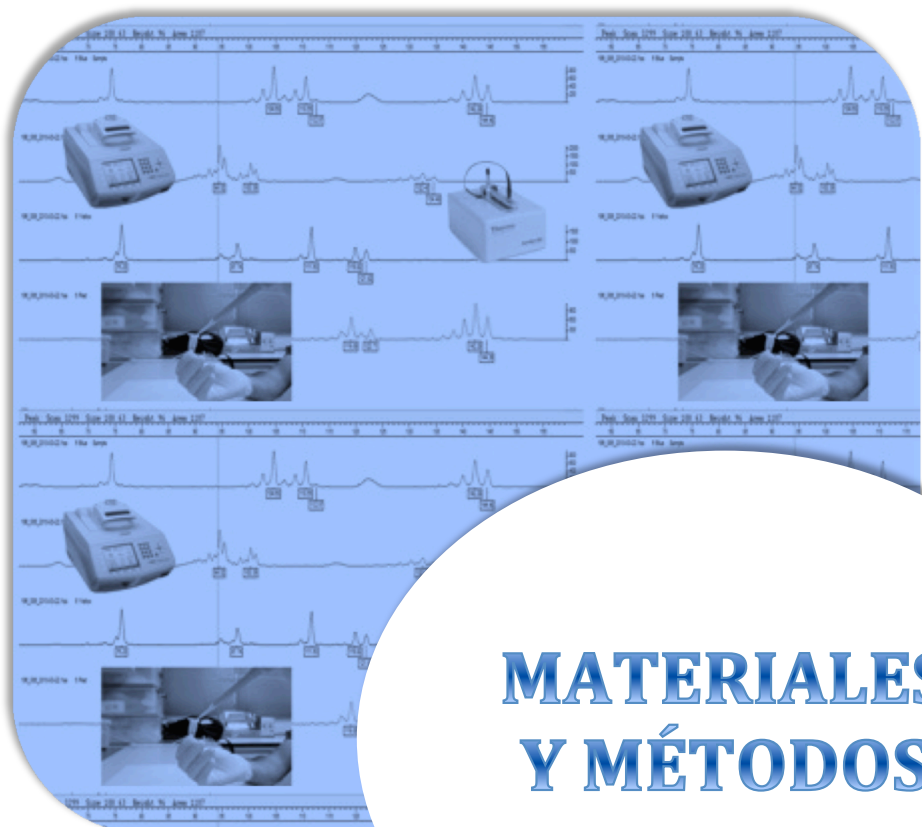
Considerando todo lo anteriormente expuesto, el objetivo general de este trabajo es desarrollar y conjugar metodología que permita desplegar e imbricar la mejora genética en el sistema de producción de corvina a escala industrial, sin que las empresas tengan que modificar su modelo de producción y negocio, dando así un valor añadido a su explotación comercial.

Para llevarlo a cabo, han sido definidos varios objetivos específicos:

1. La puesta a punto de las condiciones óptimas para el marcaje físico de la corvina, desde tallas pequeñas, con el sistema de marcaje individual *Passive Integrated Transponder* (PIT).
2. La puesta a punto de dos PCRs multiplex con marcadores microsatélites específicos e interés específicos que sean robustas, económicas y útiles para inferir las relaciones de parentesco entre stocks de reproductores y descendientes bajo condiciones industriales.
3. La estima de heredabilidades y correlaciones genéticas y fenotípicas para caracteres de interés comercial, con el fin de que el sector industrial disponga de información que le permita tomar decisiones más adecuadas de cara a explotar la rentabilidad de sus poblaciones sin modificar su idiosincrasia de producción.



INTRODUCCIÓN



MATERIALES Y MÉTODOS





II. Materiales y métodos

El desarrollo de este trabajo se dividió en 3 experimentos diferentes y complementarios. El primer experimento tenía como objeto la puesta a punto del sistema de marcaje Passive Integrated Transponder (PIT) y la evaluación del estrés posterior al marcaje en los peces. Con el segundo experimento se puso a punto dos PCR multiplex, formadas por un total de 18 marcadores microsátélites específicos e interespecíficos, para la caracterización genética de los reproductores del lote perteneciente al Instituto Canario de Ciencias Marinas, así como para la reconstrucción de la matriz de parentesco de los descendientes de los mismos. En el tercer experimento, los datos del marcaje de los peces y las dos PCRs multiplex fueron utilizados para el seguimiento y la asignación de parentesco de tres lotes de corvina criados en diferentes ambientes (en el ICCM, en las empresas ADSA y CANEXMAR), con el fin de estimar las heredabilidades, correlaciones genéticas y para los caracteres de interés comercial (crecimiento, rendimiento, calidad del pez y de la carne).

II.1. Marcaje en corvina

II.1.1. Experimento marcaje con el sistema PIT

Para conseguir el objetivo propuesto se llevaron a cabo tres experiencias a distintos pesos; 2, 3 y 4 gramos. En todas las experiencias se utilizaron corvinas procedentes de la cría intensiva realizada en las instalaciones de mesocosmos del Instituto Canario de Ciencias Marinas, en condiciones industriales. Los peces fueron aclimatados inicialmente a las condiciones experimentales durante 15 días en tanques de 1000 litros antes de ser utilizados para el marcaje.



Todos los peces fueron capturados y tratados del mismo modo, tanto los peces marcados como los no marcados o control. Se anestesiaron con aceite de clavo en un cubo de 10 litros a una concentración del 4%, con componente activo el eugenol, a partir de un stock de clavo con las siguientes proporciones; 50% clavo y 50% etanol. Posteriormente, los peces fueron pesados y medidos.

En cada uno de los tres grupos, se usaron 300 peces repartidos en tres tanques (100 peces por tanque). Dentro de cada tanque, 50 peces fueron utilizados como controles y marcados con el sistema de marcaje Visible Implant Elastomer (VIE) en la zona interorbital, tal y como ha sido descrito por Soula *et al.* (2012). La marca VIE permitió distinguir a los peces control de los peces marcados con PIT que hubieren perdido el mismo. Para marcar los peces escogidos según rango de peso, con el sistema PIT (0,1 gramo de peso y 12 mm de longitud; EID Ibérica SA – TROVAN, Madrid), los PITs fueron previamente reconocidos con el lector (AEG ID, ARE H5) y almacenados en tubos eppendorf con etanol hasta el momento de su uso (Figura II.1).

Los PITs fueron introducidos en la parte abdominal de los peces usando unas jeringas específicas para marcaje de mamíferos. Al final del proceso las lesiones provocadas por el marcaje fueron cubiertas con gel antiséptico dermatológico (Povidona iodada) para evitar cualquier infección en el pez. El proceso de marcaje fue realizado siguiendo las recomendaciones de Navarro *et al.* (2006).

Los peces se mantuvieron durante un periodo de 30 días con una tasa de alimentación del 7% de la biomasa corporal a razón de 3 tomas diarias con pienso de la empresa SKRETTING®. Las condiciones físico-químicas del cultivo durante estos 30 días fueron las siguientes: $22,75 \pm 0,4$ °C de temperatura media, 37 ‰ de salinidad, $5,64 \pm 0,4$ ppm de oxígeno y una renovación de agua por hora.



Se realizaron muestreos a los 0, 15 y 30 días para el peso y la longitud. También diariamente se colectaron los peces muertos. Al final de los experimentos se valoró la mortalidad, la tasa de retención y los parámetros de crecimiento en cada categoría de peso.

II.1.2. Valoración del estrés por marcaje

II.1.2.1. Material biológico

Con el fin de evaluar el efecto del sistema de marcaje PIT sobre el estrés en corvina, se analizó el marcador molecular CYP1A en cada categoría de peso (Figura II.2). Para lograr este objetivo, en cada experiencia, fueron utilizados 132 peces y fueron evaluados tres puntos de muestreo (0h, peces control, un día - 1d y siete días - 7d).

El efecto sobre la expresión del CYP1A entre días se evitó con la cría de peces en tres tanques separados. Por lo tanto, fueron utilizados 60 peces en cada punto de muestreo (1d y 7d), donde cada tanque contenía 10 peces marcados y 10 peces control.

Los peces fueron sacrificados con 2-fenoxietanol (1:1000 v/v) para evitar el estrés aditivo. Cuatro peces marcados y cuatro controles fueron extraídos de cada tanque, en cada punto de muestreo, y se colocaron en una bandeja de hielo y se procedió a la disección. Los hígados de cuatro peces de cada grupo se extrajeron y se mantuvieron en tubos con RNAlater (Sigma[®]), y se almacenaron a 4°C durante 24 horas. A continuación, el RNAlater fue retirado y las muestras fueron almacenadas a -80 ° C hasta su análisis.

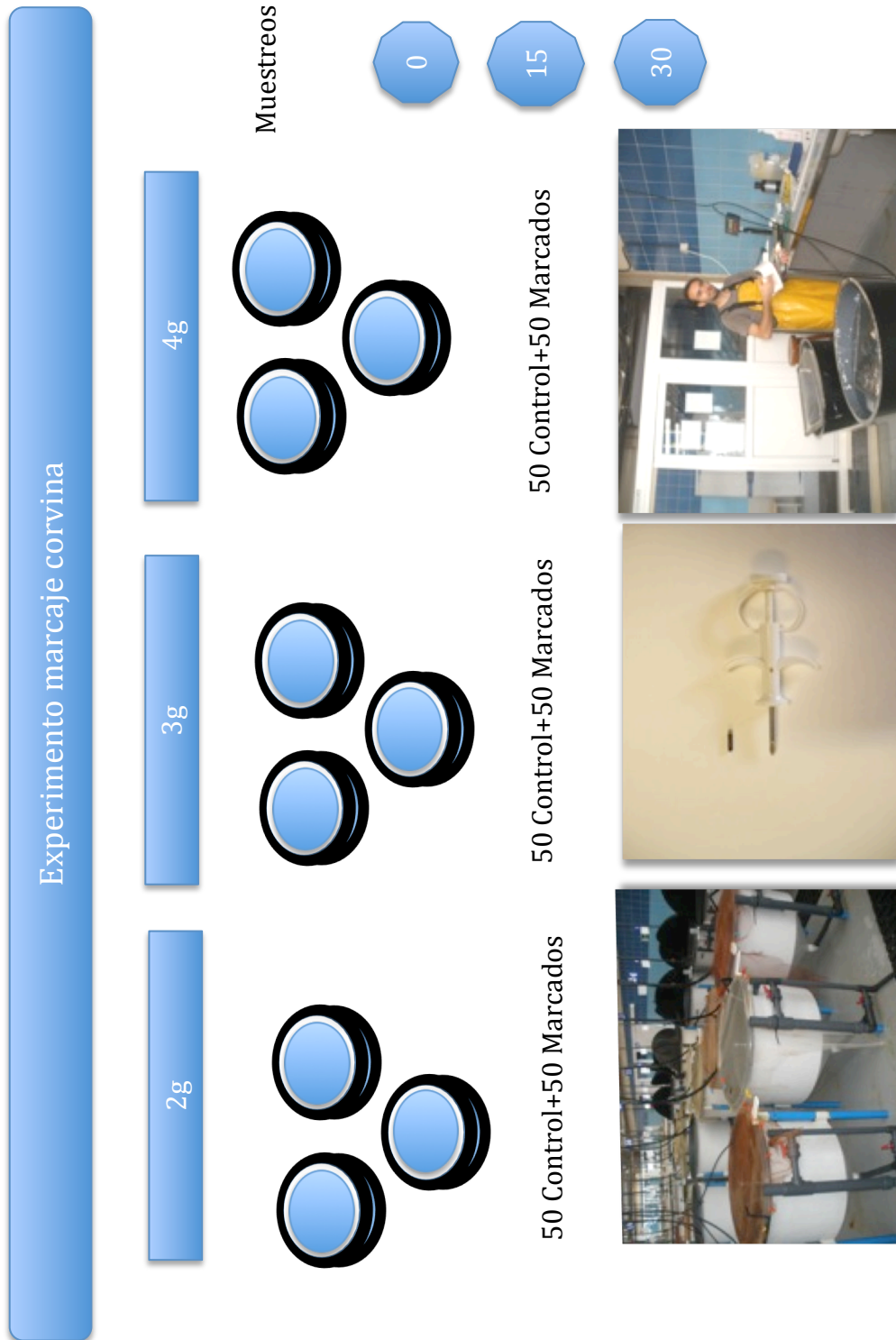


Figura II.1. Passive Integrated Transponder (PIT)



II.1.2.2. Extracción del ARN y la síntesis del ADNcopia

El ARN total fue extraído a partir de aproximadamente 100 mg de tejido, usando 1 ml del TRI-reagent (Sigma®) después de la homogenización con Tissuelyser (Qiagen®). El cloroformo y el isopropanol fueron usados para la separación y la precipitación del sedimento del ARN, respectivamente. Los pellets fueron hidratados con 200 µl de agua Milli-Q estéril, previamente tratadas con DEPC 0,1% y se mantuvieron a -80°C hasta su análisis. La concentración del ARN total, la pureza y la calidad se midieron con el espectrofotómetro NanoDrop-1000 (Thermo Scientific®). La transcripción reversa (RT) se realizó en reacciones con volúmenes de 20µl con el Kit iScript™ de síntesis de ADN copia (BioRad, Hercules, California), que contiene 1 g de ARN total. Una vez realizadas todas las transcripciones, las poblaciones de ADN copia se mantuvieron a -20°C hasta su análisis.

II.1.2.3. Diseño de los cebadores y secuenciación de los amplicones.

Los cebadores para el CYP1A y el gen constitutivo 16S ribosomal (Mueller *et al.*, 2006) fueron diseñados con el programa Gene-runner (v.3) utilizando las secuencias disponibles en la base de datos del Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI). La alineación de los genes de diferentes especies se llevó a cabo con el programa MEGA (v.4) para buscar regiones conservadas, eligiéndose los cebadores de acuerdo a criterios de tamaño de la presencia de amplificación, horquilla o dímeros y la diferencia de temperatura de fusión de imprimación. Los cebadores secuenciados están ilustrados en la Tabla III.1. Los amplicones obtenidos por la PCR fueron purificados y secuenciados utilizando el Kit BigDye® Terminator Cycle Sequencing (v3.1), siguiendo las recomendaciones del fabricante para asegurar la correcta amplificación de los genes diana. Los productos se secuenciaron en un ABI-Prism 3100 Genetic Analyzer (Applied



Biosystems[®]) y los electroferogramas se analizaron con el programa MEGA (v.4). La comparación fue realizada mediante la función BLAST del NCBI para buscar homologías.

II.1.2.4. PCR a tiempo real

Todas las reacciones de PCR se realizaron en el termociclador con módulo óptico i-Cycler (Bio-Rad[®]), utilizando 12,5 µl de brillante SYBR Green QPCR Master Mix (Bio-Rad[®]), 1 µl de una dilución de ADN copia 1:0.5 y la cantidad previamente optimizada de cada cebador en un volumen final de 25 µl. Las condiciones de amplificación consistieron en 40 ciclos de desnaturalización a 95°C durante 2 min y una extensión final de 72°C durante 30 segundos. Las temperaturas óptimas de hibridación para los genes 16S ribosomal y CYP1A, así como las concentraciones y los tamaños de los amplicones esperados, se recogen en la Tabla III.1. Se utilizó la dilución de una muestra de referencia por duplicado para obtener la curva de calibración y para calcular la eficiencia de la reacción. La expresión génica relativa fue estimada por el método de $\Delta\text{-}\Delta$ (Livak y Schmittgen, 2001).

II.1.2. Análisis estadístico

Para el análisis de las variables de peso, longitud, tasa de crecimiento diario, se utilizó el siguiente modelo lineal general (1), una vez comprobada la normalidad y la homocedasticidad de los datos, utilizando el programa SPSS v19.0;

$$Y_{ijk} = \mu + \alpha_i + \varepsilon_{ijk} \quad (1)$$

donde μ es la media de la población, α_i es el efecto fijo del tanque y ε_{ij} es el error residual de la muestra ij .

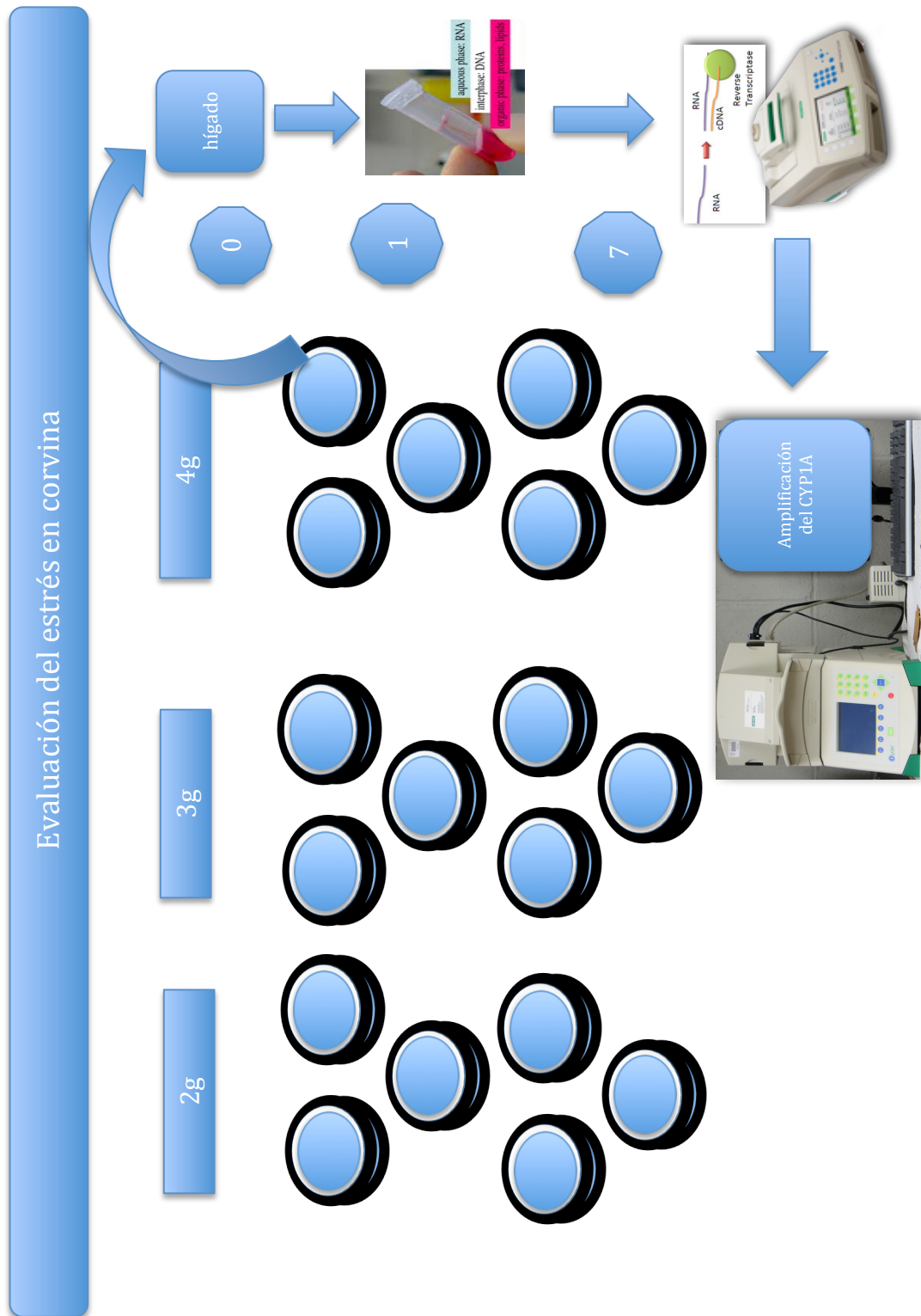


Figura II.2. Diseño experimental: evaluación del estrés por marcaje con Passive Integrated Transponder (PIT)



En el caso de la mortalidad se aplicó el siguiente modelo loglineal (2):

$$\ln f_{ij} = \mu + \alpha_i + \beta_j + \alpha\beta_{ij} \quad (2)$$

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, β_j es el efecto de la categoría j -ésima del factor, $\alpha\beta_{ij}$ es el efecto debido a la interacción de la categoría i -ésima y la categoría j -ésima.

II.2. PCRs Multiplex

II.2.1. Material biológico

En este experimento, fueron analizados un total de 577 individuos: 76 reproductores (38 hembras y 38 machos) aclimatados en las instalaciones del Instituto Canario de Ciencias Marinas (ICCM, Islas Canarias, España), la mayoría de ellos provenientes de una empresa de la Isla de Tenerife, 475 de sus descendientes fueron obtenidos por puesta masal. Un total de 19 descendientes provenían de los reproductores pertenecientes al Institut de Recerca i Tecnologia Agroalimentàries (IRTA, Tarragona, España), que fueron capturados originalmente en la costa sur de Portugal (Faro), y 7 eran especímenes silvestres (5 peces de Egipto y 2 peces de la costa de Marruecos).

Los 475 descendientes fueron marcados con el sistema PIT a los 120 días después de la incubación y fueron criados hasta los 446 días de edad. Durante este periodo, la densidad de cultivo fue entre los 6 y 13 kg/m³ y los peces fueron alimentados con piensos 62 de Ecolife (Proaqua, SA), siguiendo la tabla de alimentación ofrecida por la empresa con una tasa del 1,4 al 3% de la biomasa de los peces, y una frecuencia de alimentación de tres veces al día.



Cada 30 días, se realizaron muestreos de los peces midiendo el peso y la talla (Figura II.3). Al final del experimento cuatro puntos de interés económico fueron elegidos para ser utilizados en el análisis fenotípico y genético: 120 días después de la eclosión (DPH) es la edad de marcaje, 150 DPH es la edad a la que los adquieren las empresas de engorde, 296 DPH es el final del invierno y 446 DPH es la edad de sacrificio. A esta edad, las aletas de los peces se cortaron y conservaron en etanol absoluto a temperatura ambiente.

El ADN se extrajo de las aletas siguiendo el método del fenol-cloroformo descrito por Sambrook *et al.* (1989) con modificaciones del laboratorio de Genética Marina del Instituto Universitario de Sanidad Animal y Seguridad Alimentaria (IUSA). Dicho ADN se almacenó a 4°C en tampón TE (Tris 0,01 mM y 0.001 mM EDTA, pH 8,0) (Anexo 1). La calidad y la cantidad del ADN se evaluó mediante un espectrofotómetro Nanodrop 1000 (Thermo Scientific®).

II.2.2. Diseño de las Multiplex

En este estudio, se siguieron tres pasos para concretar el diseño final de las PCRs multiplex. En primer lugar, tras revisar el total de microsatélites descritos en la familia *Scenidae*, se escogieron 49 juegos de cebadores microsatélites que a priori cumplían las mejores condiciones de amplificación interespecífica y específica: 15 microsatélites descritos en verrugato del sur (*Argyrosomus japonicus*) (Archangi *et al.*, 2009), 11 microsatélites en corvinon ocelado (Turner *et al.*, 1998; O'Malley *et al.*, 2003), 1 microsatélite en corvinata amarilla (Farias *et al.*, 2006) y 22 microsatélites específicos descritos en la corvina (Porta *et al.*, 2010). Posteriormente, se realizó la puesta a punto de los mismos mediante barridos de temperatura de hibridación y concentración de cloruro de magnesio. Las mejores condiciones de cada marcador se utilizaron para amplificar 10



muestras en las que evaluar el potencial informativo de los marcadores que amplificaron. Los genotipos se analizaron mediante electroforesis en gel de poliacrilamida al 5% durante 2 horas (1,3 voltios/cm), y se revelaron mediante tinción de plata (Sequence™ de Sequencing DNA System, Promega), siguiendo las recomendaciones del fabricante.

En segundo lugar, sólo los marcadores que amplificaron debidamente (21 interespecíficos y 15 específicos) fueron rediseñados, sus cebadores, para amplificación en multiplex, sintetizándose a su vez con diferentes fluorocromos predeterminados para su correcta conjunción en la multiplex. Con el total de microsatélites disponibles, se diseñaron 4 PCRs multiplex, dos interespecíficas (Meagre STRi_PLEX-A y Meagre STRi_PLEX-B) y dos multiplex específicas (Meagre STRs_PLEX-C y Meagre STRs_PLEX-D) (Tabla II.1).

Finalmente, a partir de los 36 marcadores microsatélites inicialmente rediseñados, 18 fueron descartados por causas variadas como: amplificación pobre, rango de amplificación inadecuado, tamaño de los alelos o ausencia de polimorfismo. Los marcadores restantes se combinaron en dos reacciones multiplex robustas, en las que hubo que modificar algún fluorocromo y rediseñarse algún cebador; éstas quedaron compuestas por 10 microsatélites interespecíficos (STRi) y por 8 microsatélites específicos (STRs) (Tabla II.2).



Figura II.3. Muestreos mensuales y final de corvina





TABLA II.1. NOMBRE DE LOCUS, MOTIVO DE REPETICIÓN (M), FLUOROCROMOS (F), FORWARD Y REVERSE SECUENCIAS DE LOS CEBADORES Y REFERENCIAS DE CADA UNO DE LOS MICROSATÉLITES SELECCIONADOS INICIALMENTE.

<i>Meagre</i> <i>str_PLEXA</i>	M	F	Forward secuencias (5'→3')	Reverse secuencias (5'→3')	Referencias
Cac mtcl4	(CT) ₁₂	5' 6-FAM	TGTCCTCACTCCTCTCTTTTCTTTC	GTTTAAGGGCGCATCTCCAGTCTC	Farias <i>et al.</i> , 2006
UBA091	(TC) ₂₁	5' 6-FAM	ACACTCCATCTTCACTCTTACGTTTC	GTTTCACACTTAGCAACATTTTCACCTCAA	Archangi <i>et al.</i> , 2009
UBA050	(GT) ₂₆ /(GT) ₉	5' 6-FAM	GCACAACTGCATCCCTTAGAT	GTTTAGAAGTGAAGACTGCGGACTG	Archangi <i>et al.</i> , 2009
UBA854	(TG) ₂₃	5' VIC	TGTTCAGAAGCAGCTGATAAACTC	GTTTCCTGATGGATTATTTTACACCAAC	Archangi <i>et al.</i> , 2009
SOC410	(TG) ₁₇	5' VIC	CAAGCCGGAGATACTGATACTGA	GTTTGTCTGTCTGTGATATGAACCTACC	O'Malley <i>et al.</i> , 2003
SOC431	(TG) ₃₀	5' VIC	GTGGTAGATGAAAAACGTATAAAAAGGAG	GTTTCATATATATAGTGTACAGCTCCAGCTTC	O'Malley <i>et al.</i> , 2003
UBA042	(TGC) ₂₁	5' NED	TTTCTGCCTGACTAGATGTTCTTTC	GATTGTTGCTGGTTTTTCCAAAT	Archangi <i>et al.</i> , 2009
UBA853	(GA) ₂₄	5' NED	CAATGCTCAAAGTTACAGGAAACC	GTTTGCACCTCGTTTACCCCTCAC	Archangi <i>et al.</i> , 2009
SOC405	(CA) ₁₂	5' PET	AGCCTTTTGTTTAGTTCCCTCAT	GGGGGTAGCAGAACCCACAC	O'Malley <i>et al.</i> , 2003
UBA046	(GT) ₂₀	5' PET	GGGCAATGACATGTGGAC	GTTTCTGCTCCACACTTTCATCTTTT	Archangi <i>et al.</i> , 2009
UBA005	(CT) ₁₆	5' NED	CATCAGGATTGGCAACTAGC	GTTTCTCCAGGTTTATTTCTTCATTGAC	Archangi <i>et al.</i> , 2009



TABLA II.1. NOMBRE DE LOCUS, MOTIVO DE REPETICIÓN (M), FLUOROCROMOS (F), FORWARD Y REVERSE SECUENCIAS DE LOS CEBADORES Y REFERENCIAS DE CADA UNO DE LOS MICROSATÉLITES SELECCIONADOS INICIALMENTE (CONTINUACION).

<i>Meagre</i> <i>str_PLEXB</i>	M	F	Forward secuencias (5'→3')	Reverse secuencias (5'→3')	Referencias
UBA054	(CA) ₁₇	5' 6-FAM	CCTTGTGAGAACATTAATTGGATG	GTTTCCAAACCCTGATAGATGGATAGTT	Archangi <i>et al.</i> , 2009
UBA003	(AC) ₁₈	5' 6-FAM	AGACAGAAAACAGACAGGTGAGCAT	GTTTACTGCCAGAAAGCAGAGGT	Archangi <i>et al.</i> , 2009
SOC421	(TG) ₁₄	5' 6-FAM	CACTGCTCCCTCGTCACAC	GCTTTTCAGATGAACCGTTTGT	O'Malley <i>et al.</i> , 2003
SOC422	(GT) ₁₃ /(GT) ₂₂	5' 6-FAM	TCCCACAAAAGCTGTACCACA	GGCTATGACTGTTTCATCAGAAAAGTA	O'Malley <i>et al.</i> , 2003
SOC424	(CA) ₁₅	5' VIC	GTCCTCTGGACAGCAGTGTATTAG	GTTTAGCAGTGACTGAGGGTTAGGAG	O'Malley <i>et al.</i> , 2003
UBA851	(AG) ₂₈	5' VIC	GTATACTCCAAACTTTCCCCCTGA	GTTTCTTCCCCACACAGCTTTCTTCT	Archangi <i>et al.</i> , 2009
UBA053	(CA) ₁₄	5' NED	TACTTCTTCTACCCCTAAGTCTGG	GACTTTCAGTGTAGCTGTCGTTT	Archangi <i>et al.</i> , 2009
SOC044	(CA) ₂₂ /(GT) ₅	5' NED	CTAGCGTATGGAGCTACAGCTAATC	GTTTACACACACTCATGTTTTCCGTTA	Turner <i>et al.</i> , 1998
UBA005	(CT) ₁₆	5' NED	CATCAGGATTGGCAACTAGC	GTTTCTCCAGGTTTATTCTTCATTGAC	Archangi <i>et al.</i> , 2009
SOC133	(TGC) ₈	5' PET	CATTGGACCATCGCTACTG	GTTTCAAGAATGTGTTTTTCAGCTTCG	Turner <i>et al.</i> , 1998
UBA006	(CA) ₂₂	5' PET	AGCACACGTAATCACACACAGAT	GTTTCCACTAGTGCAAAAACGGTGGT	Archangi <i>et al.</i> , 2009



TABLA II.1. NOMBRE DE LOCUS, MOTIVO DE REPETICIÓN (M), FLUOROCROMOS (F), FORWARD Y REVERSE SECUENCIAS DE LOS CEBADORES Y REFERENCIAS DE CADA UNO DE LOS MICROSATÉLITES SELECCIONADOS INICIALMENTE (CONTINUACION).

<i>Meagre str- PLEX C</i>	M	F	Forward secuencias (5'→3')	Reverse secuencias (5'→3')	Referencias
GCT15	(GCT) ₇	5' 6-FAM	ATCCGGGGCGTTACTACAGTC	GTTTCTCCACACAGTGCTTTTCAGA	Porta <i>et al.</i> , 2010
CA4	(GT) ₁₅	5' 6-FAM	GCAATGACTACTGAGTCCTGGTAAAG	GATCTTGTACAGTAAGCACTCG	Porta <i>et al.</i> , 2010
CA10	(GT) ₉	5' VIC	ACCAAATAGAGACATGATGTGCAG	GGTTACACACACACACTGCTTC	Porta <i>et al.</i> , 2010
GA16	(CA) ₂₂	5' VIC	CTACACAGTCTCTCACTCACTCG	GCAGCATTGAAATTATCAGTATCATC	Porta <i>et al.</i> , 2010
CA3	(CA) ₁₂	5' NED	AAGTGGAGGCTCTTACATGAAAAC	GTGACAAAATTGGCCTTCTGTTTCTAC	Porta <i>et al.</i> , 2010
CA14	(CA) ₂₀	5' NED	ACTGAGAGTGAAGGTGGGAAACT	GTGAGTGTCTTTGTTTTTACCAACC	Porta <i>et al.</i> , 2010
GA17	(GT) ₁₂	5' PET	CTAGAGAAATTCATCCAGGGAAAGTG	GTTTAGAGCAGAGAGTTAGCGGTTGTT	Porta <i>et al.</i> , 2010
CA12	(CA) ₁₉	5' PET	GAACAATTAATGACACATCACACAA	GTTTCTCGATGGCGGATAAAAAGTTTG	Porta <i>et al.</i> , 2010



TABLA II.1. NOMBRE DE LOCUS, MOTIVO DE REPETICIÓN (M), FLUOROCROMOS (F), FORWARD Y REVERSE SECUENCIAS DE LOS CEBADORES Y REFERENCIAS DE CADA UNO DE LOS MICROSATÉLITES SELECCIONADOS INICIALMENTE (CONTINUACION).

<i>Meagre str.</i> PLEXD	M	F	Forward secuencias (5'3')	Reverse secuencias (5'3')	Referencias
CA6	(TG) ₆	5' 6-FAM	AATCTGTATGTGTGCAGATTGTG	GGGGTAAGTGCAGCAGACAT	Porta <i>et al.</i> , 2010
GTT3	(CAA) ₄	5' 6-FAM	ATCAAAGCGGTGTAATAATCACATT	GTTCCAACTAGTTTTAGTATAAGAAAAAGTAAAG	Porta <i>et al.</i> , 2010
CA13	(CA) ₁₀	5' VIC	TTTTCCTTTTTCAGTAGTCTCCTTG	GTTTATAAGGAGGACGTGAGTTGGTAG	Porta <i>et al.</i> , 2010
GA6	(GA) ₅	5' NED	GTCGTATGGCGACAGACAGG	GTTTCGTACACTACATTTTCAGTTCAAATCA	Porta <i>et al.</i> , 2010
GTT2	(CAA) ₅	5' NED	TTCAGAGAGTAATGATTGTGCAGAC	GCCTACAGGAAATCACATATCAAAC	Porta <i>et al.</i> , 2010
CA8	(CA) ₆	5' PET	AGCACAAAAGTGTTCACACAATAAC	GTTTAGCATTTCCCTCAGTTTGTATTTTG	Porta <i>et al.</i> , 2010
GA2B	(CA) ₆	5' PET	AAGTGTGGCGTCAITTCCTCT	GTATTGATGGATAGCAAGTGCAGA	Porta <i>et al.</i> , 2010



II.2.3. Condiciones de las PCRs

Los cebadores fueron rediseñados para obtener una amplificación en el rango de 70 a 154 pares de bases (pb). Las secuencias de alta complejidad fueron eludidas durante el rediseño para garantizar la sensibilidad y la especificidad del ensayo múltiple. El objetivo era obtener una temperatura de fusión teórica de $60^{\circ}\text{C}\pm 2^{\circ}\text{C}$ a una concentración de sales (K^+ , Na^+ , Tris^+ o NH_4^+) de 180 mM. Un 35-60% del contenido del GC de la secuencia del cebador se aseguró, para evitar la cartilla que se localiza en los palíndromos u homopolímeros como el poli (dT) de más de cinco bases. Todos los candidatos fueron analizados para la formación horquilla o estructuras secundarias utilizando el programa que se encuentra en Integrated DNA Technologies (<http://www.idtdna.com/Scitools/Applications/mFold/>). Las primeras estructuras secundarias estables entorno a cada región microsatélite fueron evitadas por debajo de los $-13 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$ umbral de la energía libre (Yuryev *et al.*, 2002). Las características de los cebadores han sido elegidas para garantizar la misma eficiencia de amplificación de la PCR para todos los fragmentos de ADN como se describió previamente (Sánchez *et al.*, 2003).

Inicialmente, cada grupo de cebadores fue probado individualmente en cinco muestras con el fin de corroborar una amplificación correcta con el cebador modificado, así como para detectar el tamaño de los alelos y la identificación de los microsatélites. Los marcadores de microsatélites sin amplificación individual fueron descartados de la reacción multiplex.

Las PCRs multiplex fueron optimizadas siguiendo las recomendaciones de Navarro *et al.* (2008). Por ello, se utilizó una concentración inicial de 0,2 M de cada cebador y fueron modificadas las concentraciones de los cebadores para obtener alturas de pico en



el electroferograma comprendidas entre 600 y 3000 Related Fluorescence Unit (RFU) para cada marcador microsatélite. En primer lugar, los pares de cebadores con amplificación RFU alta se redujeron y luego los de baja RFU se incrementaron. La concentración total utilizada se ajustó a 0,7 M al final del proceso. Las concentraciones y las características de los cebadores finales de la STRi y STRs se presentan en la Tabla II.2.

Las condiciones de amplificación consistieron en una desnaturalización inicial a 94°C durante 10 minutos, seguido por 30 ciclos a 94°C durante 30 segundos, 60°C durante 1 minuto y 65°C durante 1 minuto, con una extensión final a 65°C durante 60 minutos. Las reacciones se llevaron a cabo en un volumen final de 12,5 ml con las concentraciones de los siguientes componentes: 1X GeneAmp PCR Buffer II (100 mM Tris-HCl pH 8,3, KCl 500 mM) (Applied Biosystems®), 3 mM MgCl₂, 0,2 mM de cada dNTP, 0,05 unidades Gold AmpliTaq ADN polimerasa (Applied Biosystems®), 12 ng de ADN molde, y entre 0,01-0,06 M de cada cebador.

Después de obtener las concentraciones óptimas de los cebadores, todas las muestras fueron amplificadas con ambas multiplex, con el fin de confirmar la segregación de alelos de cada locus, conocer la variabilidad genética de todos los marcadores microsatélites y validar la eficacia de éstas en la determinación del parentesco entre peces.

Antes de ejecutar las reacciones multiplex en el secuenciador automático, se verificaron los productos amplificados en gel de agarosa al 2% durante 30 minutos (8 v·cm⁻¹) para evaluar la amplificación correcta de los amplicones. Más tarde, 1 µl de los productos amplificados se mezcló con 9,75 µl de formamida Hi-Di y 0,25 µl de 500 -250 LIZ GeneScan (Applied Biosystems®) como estándar de tamaño, y se procesaron en un analizador ABI Prisma-3130-XL Genetic (Applied Biosystems®) con 36 cm capilares y



usando el POP-4 como polímero (Applied Biosystems®) (60°C, 3000V, 1500). Los electrofenogramas y los genotipos fueron evaluados con los programas de GeneScan (v3.7) y Genotyper (v3.7) (Applied Biosystems, Inc.).

II.2.4. Análisis de los datos

El equilibrio de Hardy-Weinberg, la probabilidad de exclusión (PE) y la probabilidad de exclusión combinada (PEC) para la pareja de los padres posibles (Jamieson y Taylor, 1997), la heterocigosidad observada y esperada, el contenido de información polimórfica (PIC) y la frecuencia teórica de alelos nulos (Summers y Amos, 1996), se estimaron con el programa Cervus 3.0 (Kalinowski *et al.*, 2007).

Las asignaciones de los padres entre los reproductores y sus descendientes del lote del ICCM se determinaron utilizando el método de exclusión, con un programa no comercial proporcionado por Vandeputte *et al.* (2006). La coascendencia del stock se calculó utilizando el programa Sofsoq (Fernández y González-Martínez, 2010).

II.3. Estima de heridabilidades y correlaciones genéticas

II.3.1. Material biológico

En mayo del 2006, se adquirió un lote de corvinas de 140 individuos con un peso medio 1,5 kg a una empresa con jaulas situadas en la isla de Tenerife, desde donde fueron trasladadas a nuestras instalaciones del ICCM en la isla de Gran Canaria.

Los reproductores se mantuvieron en tanques de 10 m³. Una vez transcurrido el periodo de adaptación, se procedió a un primer muestreo (julio del 2006) en el que se marcaron con PITa todos los individuos supervivientes. Los peces se alimentaron con una ración del 1% de su biomasa, con una dieta comercial (Proaqua®, 10 mm).



TABLA II.2. NOMBRE DE LOCUS, FLOROCROMOS (F), FORWARD Y REVERSE SECUENCIAS DE LOS CEBADORES, CONCENTRACIONES DE LOS CEBADORES (Cp) (MM) EN LAS DOS PCR MULTIPLEX FINALES.

STRI	F	Forward sequence (5'→3')	Reverse sequence (5'→3')	Cp
Cac mic14	5' 6-FAM	TGTCCTCACCTCCTCTTTTCTTTTC	GTTTAAAGGGGCATCTCCAGTCTC	0.02
UBA054	5' 6-FAM	CCTTGTGAGAACATTAATTGGATG	GTTTCCAAACCCTGATAGATGGATAGTT	0.02
UBA050	5' 6-FAM	GCACAACCTGCATCCCTTAGAT	GTTTAGAAAGTGAAGACTGCGGACTG	0.045
UBA053	5' VIC	TACTTCCCTTACCCCTAAGTCTGG	GACTTCCAGGTGAGCTGTGCTTT	0.05
Soc431	5' VIC	GTGGTAGATGAAAACGTATAAAAGGAG	GTTTCATATATATAGTGTACAGCTCCAGCTTC	0.06
UBA042	5' NED	TTTCTGCCTGACTAGATGTTCTTTC	GATTGTGCTGGTTTTTCCAAT	0.05
UBA853	5' NED	CAATGCTCAAAGTTACAGGAAACC	GTTTGCACTCGTTCACCCCTCAC	0.02
UBA005	5' NED	CATCAGGATTGGCAACTAGC	GTTTCCCTCCAGGTTTATTCTTCATTGAC	0.03
Soc405	5' PET	AGCCTTTTGTGTTTAGTTTCCCTCAT	GGGGTGTAGCAGAACCCACAC	0.03
UBA006	5' PET	AGCACCGTAATCACACACAGAT	GTTTCCACTAGTGCAAAAACGGTGGT	0.03



TABLA II.2. NOMBRE DE LOCUS, FLOROCROMOS (F), FORWAD Y REVERSE SECUENCIAS DE LOS CEBADORES, CONCENTRACIONES DE LOS CEBADORES (Cp) (mM) EN LAS DOS PCR MULTIPLEX FINALES (CONTINUACION).

STRS	F	Forward sequence (5'→3')	Reverse sequence (5'→3')	Cp
GCT15	5' 6-FAM	ATCCGGGGGTTACTACAGTC	GTTTCTCCACACAGTGCTTTTCAGA	0.02
GA16	5' 6-FAM	CTACACAGTCTCTCTCACTCACTCG	GTTTCTGAAAACAGCGCAGCATTG	0.02
GA17	5' 6-FAM	CTAGAGAAAATTCAATCCAGGGAAGTG	GTTTAGAGCAGAGAGTTAGCGGTTGTT	0.015
CA13	5' VIC	TTTTCTTTTTTTCAGTAGTCTCCTTG	GTTTATAAGGAGGACGTTAGTTGGTAG	0.035
GA6	5' NED	GTCTGATGGGACAGACAGG	GTTTCAGCCCGTACTTTACCTACAAC	0.02
CA3	5' NED	AAGTGGAGGCTTTACATGAAAAAC	GTGACAAAATTGCCCTTCTGTTTCTAC	0.03
CA14	5' NED	ACTGAGAGTGAAGGTGGGAAACT	GTGAGTGTCTTTGTTTTTACCAACC	0.03
GA2B	5' PET	AAGTGTGGGTCATTTCTCTCT	GTATTGATGGATAGCAAGTGTGAGA	0.05



En abril del 2008, y después de una inducción hormonal, se recogió una mezcla de una puesta masal de 4 tanques de reproductores de corvina y se realizó el cultivo larvario en las instalaciones de mesocosmos del ICCM, siguiendo el protocolo de dichas instalaciones publicado posteriormente *por Roo et al. (2010)*.

A una edad de 120 días se repartió el lote de corvina en tres ambientes diferentes: en jaulas de la empresa CANEXMAR, en las instalaciones de tierra de la empresa ADSA y en las instalaciones de engorde del ICCM (Figura II.4). Estos últimos peces se marcaron con PIT y se repartieron al inicio en 14 tanques de 500 l, hasta enero del 2009 cuando se trasladaron a 12 tanques de 1000 l. Durante este periodo la densidad varió entre 6 y 9 kg/m³. Desde febrero se intento mantener los peces a una densidad media de 13 kg/m³ para lo que hubo que realizar sacrificios de algunos peces, de los que se conservaba siempre muestra de aleta para la extracción de ADN.

Durante todo el cultivo en las instalaciones del ICCM los peces se alimentaron 3 veces diarias con el pienso Ecolife 62 de la empresa (Proaqua S.A®) siguiendo la tabla de la misma empresa con una variación de tasa de alimentación entre 1,4 y 3% de la biomasa.

Entre finales de julio y agosto del 2009 se procedió a sacrificar los peces en hielo y agua en los tres lugares de cultivo. Se sacrificaron 477 peces en el ICCM, 400 en ADSA y 310 en las instalaciones de CANEXMAR. A todos ellos, se les tomo una muestra de la aleta caudal que fueron utilizadas para la extracción de ADN (apartado 3.2.1) necesario para la asignación de parentesco (apartados 3.2.3 y 3.2.4).



II.3.2. Caracteres analizados

Para la obtención de los valores de las diferentes variables a analizar, se procedió en el muestreo final de la siguiente forma. En un primer tiempo, los peces fueron pesados y medidos, se valoró el color de la piel y se tomó una foto en la posición dorsal y de perfil de manera individual. En un segundo tiempo, se procedió, a la disección del pez, en la que se pesaron el corazón, las branquias, la grasa eviscerada y el pez eviscerado, o peso de canal. Por último, se filetearon los peces, se quitó la piel y se almacenaron a -20°C al vacío. Así los caracteres analizados (Figura II.5 y II.6) durante este experimento fueron:

- ❖ **Peso**
- ❖ **Longitud total:** Longitud desde la cabeza hasta el final de la cola.
- ❖ **Compacidad** o índice de condición: Relación entre el peso y la longitud calculado como sigue: $100 \times \text{peso} \times \text{longitud}^{-3}$.
- ❖ **Análisis de imagen:** A partir de las fotos dorsales y laterales individualizadas por pez, se creó una aplicación informática para la estima de varios parámetros morfológicos: área total, área filete, área dorsal, ancho cabeza, ancho cola, ancho dorsal, ancho filete, ancho máximo, longitud cabeza, longitud dorsal, longitud filete y longitud total (Anexo 1), usando el programa MATLAB.

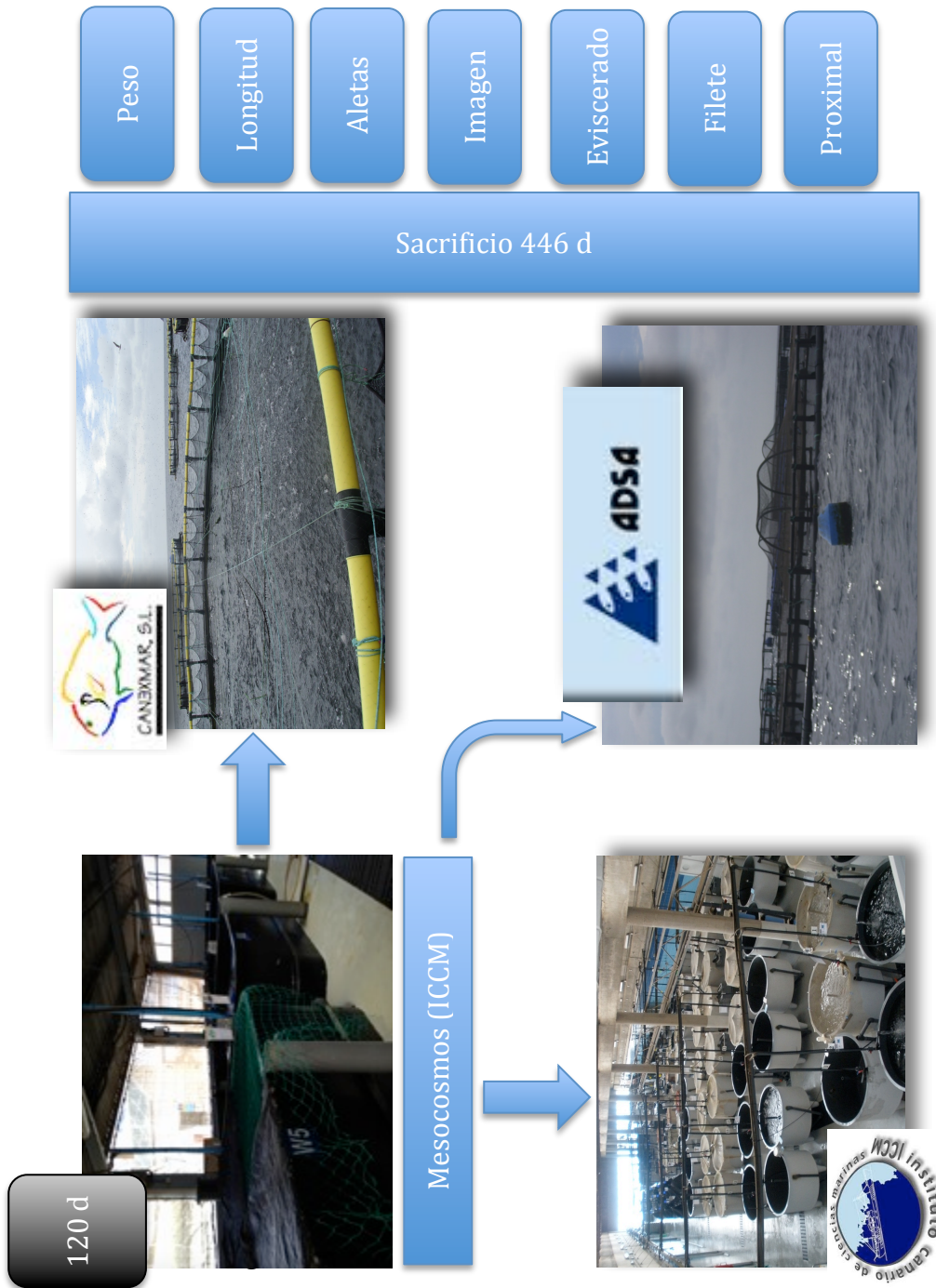


Figura II.4. Diseño del experimento y instalaciones de cultivos, ICCM, CANEXMAR y ADSA.



- ❖ **Color:** El color se determinó detrás de la aleta pectoral con un colorímetro triestímulo (Minolta Chroma Meter CR-200, Minolta, Osaka, Japón). Los parámetros de color son la luminosidad L^* (que oscila entre 0 para el negro y 100 para el blanco), la cromaticidad a^* (desde el rojo al verde) y la cromaticidad b^* (desde el amarillo al azul), de acuerdo con las recomendaciones de la Comisión Internacional del Alumbrado, CIE (1976). Mediante el a^* b^* se calculó el valor de la tonalidad (Hab). El color observable (Hue), que es una medida angular en la que 0° indica un color rojo, 90° denota un tono amarillo, 180° un color verde y 270° un color azul, se calculó mediante la ecuación: $Hab = \arctg (b^* / a^*)$ (Hunt, 1977).
- ❖ **Peso canal:** Peso del pez una vez eviscerado manualmente (incluyendo el riñón) y secado.
- ❖ **Rendimiento canal:** Peso canal expresado como porcentaje del peso del pez sin eviscerar ($100 \times \text{peso canal} \times \text{peso pez}^{-1}$).
- ❖ **Peso filete:** Peso de ambos filetes del pez, tras haber quitado la piel y haber fileteado manualmente, sin incluir ni el lomo y ni la ventresca.
- ❖ **Rendimiento filete:** Porcentaje del peso de los filetes respecto al pez eviscerado ($100 \times \text{peso filete} \times \text{peso pez}^{-1}$).
- ❖ **Grasa Visceral:** Peso de la grasa que se encuentra dentro de la cavidad visceral del pez.
- ❖ **Porcentaje Grasa Visceral:** Peso de la grasa que se encuentra dentro de la cavidad visceral del pez respecto al peso total ($100 \times \text{peso grasa visceral} \times \text{peso pez}^{-1}$).
- ❖ **Peso ventricular:** Peso del ventrículo extraído.



- ❖ **Porcentaje ventricular:** Peso del ventrículo extraído del pez, respecto al peso total ($100 \times \text{peso ventrículo} \times \text{peso pez}^{-1}$).
- ❖ **Peso de las branquias:** Peso de ambas branquias juntas.
- ❖ **Porcentaje de las branquias:** Peso de las branquias extraídas del pez, respecto al peso total ($100 \times \text{peso Branquillas} \times \text{peso pez}^{-1}$).
- ❖ **Humedad:** Peso de agua perdida de una porción del músculo mantenida a una temperatura de 105°C hasta que no varía su peso. La cantidad de humedad se expresó como porcentaje de carne húmeda (Anexo 1).
- ❖ **Cenizas:** Precalcinado de la muestra en placa calefactora, evitando que se inflame, tras ello e incinerada en la mufla a 550°C durante 8 horas, hasta cenizas blancas grisáceas. La cantidad de cenizas se expresó como porcentaje de carne húmeda (Anexo 1).
- ❖ **Grasa muscular:** Cantidad de grasa mediante el método *Soxhlet*. Hasta su pesado se mantuvo en el desecador. La cantidad de grasa se expresó como porcentaje de la grasa seca (Anexo 1).
- ❖ **Colágeno:** Cantidad de colágeno en una muestra de filete por el método descrito por Palka (1999). Método basado en la determinación de la cantidad de hidroxiprolina por valoración colorimétrica, previa hidrólisis en medio ácido de las proteínas y oxidación de la hidroxiprolina, puesto que éste es un aminoácido abundante en el colágeno y poco frecuente en otras proteínas. Para convertir la cantidad de hidroxiprolina en colágeno, se utilizó el factor de 8 usado en lubina (Periago *et al.*, 2005). Se expresó como miligramo de colágeno por gramo de carne húmeda.



II.3.3. Análisis de datos

Todos los descendientes y los reproductores se genotiparon utilizando las dos PCRs múltiplex, la STRi y la STRs (apartado 3.2) y la asignación se realizó con el método de exclusión, utilizando el programa de Vandeputte *et al.* (2006).

Los datos de todas las variables, previamente comprobada su normalidad y su homogeneidad de varianzas, se analizaron aplicando un modelo lineal general, para detectar la significación del efecto tanque y estación utilizando el programa SPSS (v 19.0) (SPSS, Chicago, IL, EE.UU.). En el caso de las variables de calidad, fue necesaria la transformación logarítmica.

La repetibilidad de los caracteres de la composición de la carne se calculó usando el programa SPSS (v 19.0), mediante el siguiente modelo lineal:

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

donde Y es el dato del pez, μ es la media de la población, F_i es el efecto fijo del individuo y ε_{ij} es el error residual (réplica). Las componentes de varianza de todos los caracteres considerados en este estudio se estimaron por máxima verosimilitud restringida (REML) utilizando el programa VCE (v 6.0) (Kovač *et al.*, 2002), mediante el siguiente modelo lineal:

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

donde y es el dato del carácter, β los efectos fijos (estación y tanque), u es el efecto animal aleatorio y ε el error residual. Las magnitudes de las estimas de las heredabilidades se establecieron siguiendo la clasificación de Cardellino y Rovira (1987), en la que se consideran bajas entre 0,05 y 0,15, medias entre 0,20 y 0,40, altas entre 0,45



y 0,60 y muy altas las superiores a 0,65. Respecto a las correlaciones se clasificaron como bajas (0-0,40), medias (0,45-0,55) y altas (0,60-1), independientemente del signo.



Figura II.5. Muestreo para los caracteres de la carcasa y de calidad analizados.



Figura II.6. Detalles de los protocolos de trabajo para los caracteres de calidad analizados.



MATERIALES Y MÉTODOS

Evaluation of PIT tagging system as method to tag fingerlings of meagre (*Argyrosomus regius*); its effect on growth, survival, tag retention and fish stress.

fish stress.

growth, survival, tag retention and
(*Argyrosomus regius*)? its effect on



III. Evaluation of PIT tagging system as method to tag fingerlings of meagre (*Argyrosomus regius*); its effect on growth, survival, tag retention and fish stress.

III.1. Abstract

Meagre (*Argyrosomus regius*) is one of the new species in Mediterranean aquaculture. In this study, the optimal fish size for *Passive Integrated Transponder* tagging system (PIT) was examined, more concretely, its effect on fish growth, survival and tag loss rates. Fish of three weight classes (2-3 g, 3-4 g and 4-5 g) were studied. For each one, 300 fish (150 tagged and 150 untagged fish) were distributed in three tanks and used. Results showed that PIT tagging did not effect on fish growth in any weight class. The corrected mortality rate was 9.9%, 13.6% and 6.6% for weight classes 2-3g, 3-4g and 4-5g, respectively, and it was concentrated in the first days after tagging. Tag loss rate was null in all three weight classes. With respect to fish stress, CYP1A gene expression was evaluated at 0 hours, 1 day and 7 days after tagging (sampling points), for 2 g and 4 g weight classes. At 2 g weight class, an effect of tagging on CYP1A gene expression was detected. At 4 g weight class, not significant difference between tagged and untagged fish, at any sampling points, was detected. These results suggest that the most appropriate size for tagging meagre fingerlings is from 4 g onwards, with minimum effect on mortality and without effect on fish growth and tag loss rates and fish stress.

Keywords: Meagre, *Argyrosomus regius*, Passive Integreted Transponder, PIT, stress, welfare, Cytochrome P450.



III.2. Introduction

Meagre (*Argyrosomus regius*), a marine *Scianedae*, is one of the most promising species for Mediterranean aquaculture due to its rapid growth rate, good quality and excellent conversion rate (Quéméner, 2002). These factors, taken together with wide saline range of meagre, had allowed its fast expansion in European and African aquaculture, with an exceptional production increase in the last 7 years (APROMAR, 2011).

Even meagre production can be widely improved by development of its culture conditions in nutrition, engineering techniques, reproduction or genetics (Poli *et al.*, 2003; Lagardère y Mariani 2006; Hernández *et al.*, 2009; Roo *et al.*, 2010). It is usually produced by mass spawning in order to have a high quality of eggs and rentability. Mass spawning reduces the common environmental sources of variation (Herbinger *et al.*, 1999), but it also prevents the traceability of fish genealogy (Jennings *et al.*, 2009). However, to introduce improving by genetic programs through the estimation of breeding values for economic traits, the coefficient of relatedness (between breeders and descendants) must be known. It can be achieved by combination of molecular genetic markers and physical tagging system (Navarro *et al.*, 2009a, 2009b)

Passive integrated transponder (PIT) is an individual and internal physical tagging system widely used in fish because it has a low effect on fish survival and growth and high retention rates at small sizes (Prentice *et al.*, 1990; Nunnallee *et al.*, 1998; Ombredane *et al.*, 1998, Baras *et al.*, 1999, 2000; Navarro *et al.*, 2006; Soula *et al.*, 2012). However, species show different PIT acceptance degrees due to biological characteristics of fish and welfare condition requirements, so is difficult to interpolate tagging conditions between species, and these have to set up for each species.



Nowadays, European (Council Directive 86/609/EEC), National (Royal Decree 1201/2005), and Regional (Decree 117/1995) legislations regulating the welfare experimental conditions, due to inappropriate breeding techniques so management produce fish stress and, consequently physiological equilibrium degradation (Barton and Iwama, 1991; Barcellos *et al.*, 2001, 2004; Biswas, 2006). In this sense, to trace the fish welfare by stress is important. Many studies were realized to control the stress reaction caused by fish confinement and manipulation (Barton *et al.*, 1998, Barton, 2000; Bayunova *et al.*, 2002; Lankford *et al.*, 2003, 2005; Wuertz *et al.*, 2006; Webb *et al.*, 2007). These studies used serum and plasma cortisol concentration (Barton, 2002), heat shock proteins (Iwama *et al.*, 1998) and cytochrome P450 monooxygenase (Jørgensen *et al.*, 2001; Gornati *et al.*, 2004). The cytochrome P450 1A (CYP1A) is important in the biotransformation of xenobiotics (Andersson and Forlin, 1992, Goksøyr and Forlin, 1992; Stegman and Hahn, 1994), and it has also been used as biomarker in environmental biomonitoring studies (Goksøyr y Forlin 1992) due to its adaptative response (Ortíz de Montellano, 2005). However, only plasma cortisol and heat shock proteins have been measured as physiological factors for PIT tagging system in rainbow trout (Feldhaus *et al.*, 2008).

III.3. Materials and Methods

III.3.2. Physical tagging experiments

III.3.2.1. Design and conditions

To achieve the proposed objectives of this study, three experiments were realized at different fish weights; 2, 3 and 4 g. In all experiments, meagre fingerlings from the mesocosm facility at Instituto Canario de Ciencias Marinas (ICCM) were used. Before



tagging, fish were initially acclimated to the experimental conditions during 15 days in 1000 l tanks. Tagged and untagged fish were manipulated equally along experiments (capture, anesthetized and sampled). For anesthetized process, fish were subjected a 0.002% clove oil solution, from a stock of 50% clove oil and ethanol.

In each experiment, 300 fish were used and distributed in three tanks, each one containing 100 fish, where 50 fish were tagged with tagging system *Passive Integrated Transponder* (PIT; 0.1 g and 12 mm in length, EID Ibérica SA-TROVAN), in the abdominal cavity, according to the tagging protocol previously reported by Navarro *et al.* (2006). The other 50 fish were used without tag, untagged or control fish. To distinguish between PIT tagged fish that there were lost tag and untagged fish within the same tank, control fish were previously tagged by tagging system VIE in the head between the eyes, to estimate exactly the PIT tag retention. In spite of that VIE tag has not effect on growth and survival for different species (Astorga *et al.*, 2005; Soula *et al.*, 2012), Previous experiments were carried out in order to check that there were no VIE tagging system effect on meagre growth and/or survival (unpublished data). Fish were reared during 30 days under the same temperature, salinity and dissolved oxygen of water conditions ($22.5\pm 0.35^{\circ}\text{C}$, 37‰ and 6.20 ± 0.43 ppm, respectively). Fish were fed three times per day with a specific feed rate of 7% using a commercial diet (Skretting[®], Spain).

III.3.2.1. Growth, mortality and tag retention rates, and wound healing

Samplings for weight and length were performed at 0 hours (0h), 15 and 30 days (15d and 30d, respectively). Concerning mortality and tag retention rates, fish were daily measured, being presented as accumulated data at 15 and 30 days. Wound healing was



visually evaluated at 15 and 30 days by a numeric scale (1, total healed; 2, partially healed; 3, not healed).

III.3.3. Molecular stress experiments

III.3.3.1. Fish rearing and sampling

In order to precise the effect of tagging system on fish stress, the genetic expression of CYP1A molecular marker was quantified in each weight class,. To achieve it, 132 fish per weight class were used. Three sampling points were considered (0h, zero hours; 1d, one day; 7d, seven days). CYP1A expression influence on each other was avoided by rearing fish in three separated tanks. Thus, 60 fish were used in each sampling point (1d and 7d), each tank containing 10 tagged fish and 10 untagged fish (control).

Fish were slaughtered with 2-phenoxyethanol (1:1000 v/v) to avoid additive stress. At each sampling point, four untagged and four tagged fish were slaughtered from each tank, and placed on ice and dissected. Livers from each group of four slaughtered fish were extracted and kept in tubes with RNAlater™ (Sigma®), then, they were incubated at 4°C for 24 hours. Later, RNAlater™ was removed and samples stored at -80°C.

III.3.3.2. RNA extraction and cDNA synthesis

After homogenization of, approximately, 100 mg of tissue with *Tissuelyser* (Quiagen®), 1 ml *TRI Reagent* (Sigma® Ambion) was added and total RNA was extracted, by adding. Then, chloroform and isopropanol were used to separate and precipitate, respectively. Pellets were hydrated with 200 µl of Milli-Q sterile water, previously treated with 0.1% DEPC, and kept at -80°C until analysis. Total RNA concentration, purity and quality were measured by *NanoDrop 1000 Spectrophotometer*



(Thermo Scientific[®]). The reverse transcription (RT) reactions were carried out in 20 μ l volumes with *iScriptTM cDNA Synthesis Kit* (Biorad[®]), containing 1 μ g of total RNA. After that reactions, all cDNA populations were kept at -20°C until analysis.

III.3.3.3. Primer design and amplicons sequencing

Primers for CYP1A gene and 16S ribosomal housekeeping gene (Mueller *et al.*, 2006) were designed by *Gene Runner* software v.3. and from National Center for Biotechnology Information (NCBI) free sequences. Alignment with other species was carried out by MEGA v.4 to search conserved regions. Primers were chosen according to the amplicon size, hairpin or dimmers presence and difference in melting primer temperature. Primer sequences are shown in Table 3. To ensure the correct amplification of the target genes, amplicons obtained by PCR were purified and sequenced by using the *BigDye[®] Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit* and following the recommendations of the manufacturer. The sequencing products were run on an *ABI Prism 3100 Genetic Analyzer* (Applied Biosystem[®]), and electropherograms were analyzed in MEGA v.4 software. To search for homology, the Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) was performed by NCBI.

III.3.3.4. Real-Time PCR

All PCR reactions were performed in *i-cycler* with optical module (Bio-Rad[®]), and a final volume of 25 μ l, using 12.5 μ l *Brilliant SYBR Green qPCR Master Mix* (Bio-Rad[®]), 1 μ l of the cDNA (1:5 dilution) and an amount previously optimized of each primer. Running conditions consisted of 40 cycles with a first step of denaturation at 95°C for 2 min, and a final extension of 72°C for 30 sec. The annealing temperature was optimized for CYP1A gene and 16S ribosomal, as shown in Table III.1, together with concentrations



and amplicon expected sizes. Dilutions of a reference sample were used, and run in duplicate to obtain the calibration curve and calculate the reaction efficiency. Relative gene expression was estimated by the Δ - Δ method (Livak and Schmittgen, 2001).

III.3.4. Data analysis

All data were tested for normality and homogeneity of variances. Weight data were statistically analyzed by the statistical package SPSS v19 (SPSS, Chicago, IL, USA), according to the following General Linear Model, where tank and tag are considered fixed factors:

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

where μ is the population mean, α_i the fixed effect of the tank, β_j the fixed effect of the tag, $(\alpha\beta)_{ij}$ the interaction between factors, and ε_{ijk} the residual error.

Mortality data and tag loss rate were calculated as a cumulative percentage at the end of the experiments, and analyzed according to the following loglinear model:

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

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



TABLE III.1. SEQUENCE, TEMPERATURE ANNEALING (T_m), ACCESSION NUMBER, EXPECTED SIZE (ES) AND FINAL CONCENTRATION (CF) IN RT REACTION SIZES OF AMPLICONS OF THE PRIMERS USED IN THIS STUDY.

Gene	Primer	PRIMERS SEQUENCE 5'-3'	Accession number	T_m (°C)	Es (pb)	Cf (pmoles/ μ l)
CYP1A	Forward	AACTCC AAT GTC CAG ATG TCA G			151	0.6
	Reverse	TTC CTC TAT CTCTGG GTA AGC		51		
16S ribosomal	Forward	AAC AGA CCC GCC AACTAG	DQ916162		170	1
	Reverse	GGC AGG ACCTCT TAT TCG				

III.4. Results

III.4.1. Growth, mortality and tagging loss at different sizes

At the beginning of the experiments, none of the three tagging sizes showed any statistically significant difference between tagged and untagged fish in weight and length ($P > 0,05$) (Table III.2). At 15 days after tagging, a statistically significant difference was shown in weight and length between tagged and untagged fish ($P < 0.05$) for 3 g and 4 g weight classes, and only in length for 2 g weight class. At the end of the experiments, there were no statistically significant differences in weight and length between tagged and untagged fish for 2 g and 4 g weight classes ($P > 0,05$), but it was statistically significant different for 3g weight class ($P < 0.05$).



Mortality was accused in the first day of experiments for all weight classes, being higher and significant in tagged fish versus untagged fish (Table III.2). At 15 days after tagging, data showed a corrected mortality with respect to untagged fish of 9.9%, 13.6% and 6.6% for 2 g, 3 g and 4 g weight classes, respectively. Being obtained statistically significant differences between tagged and untagged ($Z_{\text{tagged_untagged}}$ values -4.16, -5.04 and -3.45, respectively). At the end of the experiments, corrected mortalities were 12.2%, 14.2%, and 4.3% at 2 g, 3 g and 4 g weight classes, respectively, and statistically significant differences ($Z_{\text{control_tagged}}$ values -4.57, -5.02 and -2.25, respectively).

Retention rates were high in all weight classes (98.7%, 92.8% and 99.3% for 2 g, 3 g and 4 g, respectively) without differences retention rate between 15d and 30d after tagging. Concerning healing time, at day 15 after tagging, a total wound healing was observed for 84% of tagged fish in all weight classes (80%, 84% and 87% for 2 g, 3 g and 4 g, respectively). At day 30, all tagged fish showed 100% wound healing rate (Table III.3).

III.4.2. Evaluation of tagging system on fish stress

CYP1A was evaluated at 0 h, 1d and 7d after tagging for 2 g and 4 g weight classes, results are resumed in Figure III.1. Statistical analysis showed no significant difference between tagged and untagged fish, in every sampling point, for both weight classes. However, a statistically significant difference was detected within experiment, between sampled point at 1d and 7d. So, a major expression of CYP1A gene was observed at 7 days in both experiments. Likewise, the same sampling point showed a statistically significant difference between experiments, being the highest expression observed in the lowest body weight fish.



TABLE III.2. BODY WEIGHT (W), LENGTH (L) AND MORTALITY (M) IN TAGGED AND UNTAGGED FISH AT 0, 15 AND 30 DAYS FOR 2, 3 AND 4 G. EXPERIMENT IN MEAGRE.

	2g			3g			4g		
	Tagged	Untagged	Total	Tagged	Untagged	Total	Tagged	Untagged	Total
0 day	N	150	153	303	151	151	147	154	301
	W (g)	2,59±0,02	2,58±0,02	2,59±0,01	3,51±0,02	3,5±0,02	4,56±0,02	4,54±0,02	4,55±0,01
	L (cm)	5,84±0,02	5,84±0,03	5,84±0,02	6,58±0,02	6,6±0,02	7,15±0,02	7,13±0,02	7,14±0,01
15 day	N	103	137	240	92	132	120	146	266
	W (g)	4,97±0,08	5,16±0,07	5,08±0,05	6,61±0,1 ^a	7,16±0,07 ^b	9±0,07 ^a	9,53±0,08 ^b	9,33±0,06
	L (cm)	7,05±0,05 ^a	7,17±0,04 ^b	7,12±0,03	7,78±0,05 ^a	8,01±0,03 ^b	8,57±0,03 ^a	8,73±0,03 ^b	8,66±0,02
	M (%)	15,2 ^a	5,3 ^b	20,5	19,7 ^a	6,3 ^b	9,3 ^a	2,7 ^b	12
30 day	N	84	124	208	79	123	119	139	258
	W (g)	7,76±0,15	7,64±0,13	7,69±0,1	10,44±0,17 ^a	11,36±0,17 ^b	13,67±0,2	14,09±0,2	13,9±0,1
	L (cm)	8,23±0,06	8,15±0,04	8,18±0,03	8,99±0,05 ^a	9,18±0,05 ^b	9,82±0,04	9,94±0,04	9,88±0,03
	M (%)	21,8 ^a	9,6 ^b	31,4	23,4 ^a	9,2 ^b	9,3 ^a	5 ^b	14,3

Value within each row not sharing the same letter are significantly different (P<0.05).



TABLE III.3. WOUND HEALING RATE IN TAGGED MEAGRE AT 2, 3 AND 4 G. WEIGHT CLASSES.

	15 d Wound healing			Wound healing final		
	total	Almost total	no	total	Almost total	no
2g	80.2	15,8	4	100	0	0
3g	84.8	12	3.3	100	0	0
4g	87.3	11	1.7	100	0	0
Total	84.2	12.9	2.9	100		

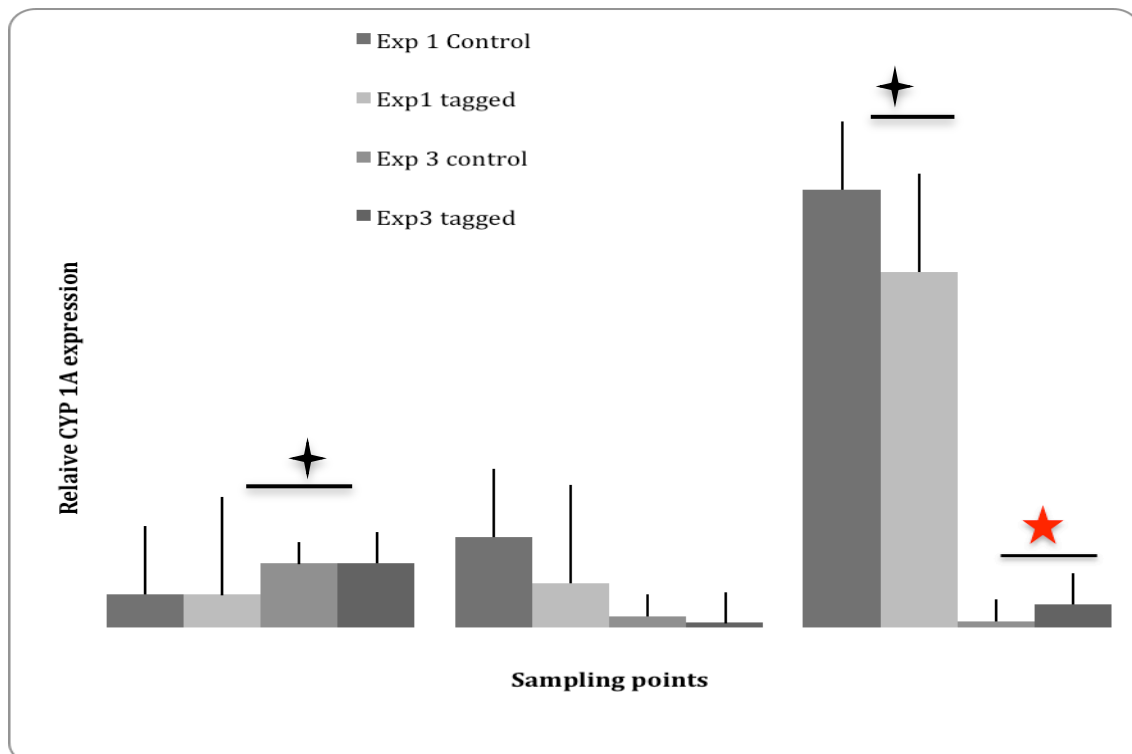


Figure III.1. CYP1A expression evaluation for tagged and untagged fish at 0h, 1d, 7d after tagging.



III.5. Discussion

III.5.1. Evaluation of tag system

Tagging systems are an important research tool that permit to track fish migration, spawning behaviour, growth and survival. Fish farms also use tagging for selection and rearing to know fish traceability (Nielsen, 1992). Tagging systems need to be tested for every species because of their difference in susceptibility to anaesthesia and manipulation, capacity for recovery, growth rate and morphology (Navarro *et al.*, 2006). In this sense, it is important that tagging systems do not interfere with long-term growth. This study showed that there is no effect of PIT tagging system on growth from 2 g weight class (3 g weight class fishes do not corroborate this data because they suffered from bacterial infection during this experiment).

At the same time, 4-g weight class tagged fish showed lower weights than untagged fish after the two first weeks, which was compensated at day 30. This PIT effect after tagging and compensatory growth has also been reported in other species like Nile tilapia (Baras *et al.*, 1999), Eurasian perch (Baras *et al.*, 2000), rainbow trout (Bateman and Gresswell, 2006), gilthead seabream (Navarro *et al.*, 2006), brown trout (Acolas *et al.*, 2007), olive flounder (Lee *et al.*, 2009), juvenile pikeperch (Hopko *et al.*, 2010), and red porgy (Soula *et al.*, 2012).

In this study, mortality reported an inverse correlation with weight class, where higher mortalities were presented for lower weight classes. This is in concordance with results of Mahapatra *et al.* (2001), who found mortality rates of 20%, 12%, 10% and 2% at 2–4 g, 4–6 g, 6–8 g and 8–15 g rohu carp (*Labeo rohita*) fish, respectively. Other authors described different mortalities depending on fish size for gilthead seabream fingerlings



(14.3% in 2-3 g fish, 3.4% in 3-4 g fish and 2.7%, in 4-8 g) (Navarro *et al.*, 2006), and in red porgy (45,7% and 14 % at weight classes 5-10 g and 10-20 g, respectively) (Soula *et al.*, 2012). Moreover, Sigourney and Horton (2005) reported a positive correlation between fish survival and fish size on 2.5 g Atlantic salmon (*Salmo salar*). Pires *et al.* (2010) observed mortality rate ranged between 0 and 8% for 80 Iberians cyprinid fish with length between 66 mm and 124 mm. Although, in olive flounder, a mortality rate of 5% was detected in higher weight fish (502 g) (Lee *et al.*, 2009). These results confirm that mortality, after PIT tagging, depends on each physiology species and stress caused by manipulation.

In this study, retention rate was high and satisfactory. Data were in concordance with the majority of studies where retention rate ranged from 95% and 100%, as in juvenile chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*) (Prentice *et al.*, 1990), in Atlantic salmon (Zydlewski *et al.*, 2009), in gilthead seabream (Navarro *et al.*, 2006), in cyprinid fish (Bolland *et al.*, 2009), in kelp grouper (*Epinephelus bruneus*) (Park y Park, 2009) and in red porgy (Soula *et al.*, 2012).

Wound healing rates were in concordance with Soula *et al.* (2012) for red porgy, and by Navarro *et al.* (2006) for 2-8 g for gilthead seabream. However, in this study, at day 15 after tagging, a higher wound healing was detected in higher weight size fish. This contrast with data reported by Knapkens *et al.* (2007) and Soula *et al.* (2012), who found a mean wound healing time lower for small size fish.

Taken together, our results demonstrate that, from 2 g. weight, there is no tag effect on growth at long-term experiments. Furthermore, the higher tag retention rate and fast wound healing support the possibility to tag fish from 2 g weight. However, the higher



mortality for 2 g and 3 g weight classes respect to 4 g weight points out 4 g weight class as an ideal body weight to tag meagre fingerlings.

III.5.2. Evaluation of PIT tagging system on fish stress.

Understanding physiological fish reaction to PIT tagging system is an added value to adjust the optimum conditions and healthy behaviour of fish during and after tagging process. In this sense, Feldhaus *et al.* (2008) observed that handling and PIT tagging were stressful during the first 2 hours after tagging for rainbow trout, being cortisol a physiological indicator. Genetic expression of CYP1A gene may be too influenced by endogenous factors as cortisol (Quabius *et al.*, 2005). This gene has mainly been used as xenobiotic biomarker in fish (Jönsson *et al.*, 2010; Celander *et al.*, 2011), and its derivated disease susceptibility (Bravo *et al.*, 2011). Sampling and tagging represent stressful situations which cause an increase of plasma cortisol in fish (Jørgensen *et al.*, 2001; Feldhaus *et al.*, 2008), and can modulate the gene expression of several stress related genes.

In this study, there is not any statistically significant difference of CYP1A gene expression between tagged and untagged fish, at any sampling point, confirming that PIT tagging system was not effect on that fish stress physiological marker. At the same time, a clear effect of the management process on CYP1A gene expression has been reported, at the lowest weight class. These data report that fish with low weight show a high sensitivity under manipulation. Using cortisol as indicator, the same tendency was observed in rainbow trout at first day after tagging. However, this increase was followed by a rapid recovery in subsequent days (Feldhaus *et al.*, 2008). While, for 4 g weight class, there was not significant effect among sampling points, and comparing experiment 1 and experiment 3, these results prove that CYP1A gene expression, after PIT tagging,



has a clear relationship with fish weight. Higher weight meagres had more capacities to accept and to respond to the fish tagging system process manipulation. The lower genetic expression of CYP1A in the experiment 3 with respect to the experiment 1 confirms that 4 g is the best weight class for PIT tagging meagre without significant effects on fish behaviour and with lower stress response.

These data confirm the role of CYP1A as a general stress protein (Morel and Barouki, 1999; Andrews, 2000). In fact, this gene have been used as indicator in the evaluation of the confinement process in fish (Gornati *et al.*, 2004; Olsvik *et al.*, 2006), as well as immunity response in human (Fujii-Kuriyama and Kawajiri, 2010).

III.6. Conclusion

In this study, data for growth, mortality and tag retention rates and fish stress showed that the optimum weight for meagre tagging with PIT tagging system is from 4 g weight. In addition, CYP1A has been reported as biomarker to evaluate meagre stress caused by PIT tagging process.

III.7. Acknowledgment

Authors wish to thank all technicians of Instituto Canario de Ciencias Marinas. This study has been supported by a Canary Government project (ACISII-PI 2007/052) and by a doctoral grant from the Agencia Española de Cooperación Internacional (AECID).



EVALUATION OF PIT SYSTEM

**Genetic variation for growth traits
at different ages on meagre
(*Argyrosomus regius*), under mass
spawning determined parental
assignment by using two new
multiplex PCRs**

multiplex PCRs

multiplex PCRs



IV. Genetic variation for growth traits at different ages in meagre (*Argyrosomus regius*), under mass spawning determined parental assignment by using two multiplex PCRs.

IV.1. Abstract

In this study, for the first time on meagre (*Argyrosomus regius*), and under industrial conditions, heritabilities and genetic correlations among growth traits are reported. Two Multiplex PCRs (intra-specific or STRs and inter-specific or STRi) were used to determine genotypes for 17 microsatellites, to reconstruct genealogy and to estimate additive genetic variation at different growth ages. Breeders from different sources and 475 of their descendents were analyzed for validation purposes. On breeders, the number of alleles per marker ranged from 2 to 13, and the mean observed heterozygosity was 0.61 for STRi, and 0.59 for STRs. For each multiplex PCR, the a priori combined exclusion probability was higher than 0.99, and the mean value of polymorphic information content was 0.56 for STRi and STRs. These two new multiplexes allowed to successfully assign 77.7 % of descendents to a single pair parents from 76 breeders. Only 22 dams and 21 sires contributed to mass spawn. Heritabilities for weight and length at 120, 150, 296 and 446 days post hatch (DPH) were low and the correlation from phenotypic point of view with slaughtering weight trait, 446 DPH (0.45 to 0.7). Genetic correlations were high between weight and length at different ages. These data suggest that direct genetic selection on growth traits, from early life stages, is possible in meagre, under industrial culture conditions.



Keywords: Meagre, *Argyrosomus regius*, microsatellites, multiplex, pedigree, heritability, genetic correlation, growth.



IV.2. Introduction

Meagre (*Argyrosomus regius*) is a new emergent species in Mediterranean aquaculture due to its fast growth rate, adaptability and facility to be handle during breeding period. It is a highly fecund species widely distributed with important market prices and is well accepted by consumers (Pastor *et al.*, 2002; Quéméner, 2002). Its culture, reproduction and on-growing were initially developed in France at the beginning of 2000 (Poli *et al.*, 2003). Thereafter, meagre production has considerably increased and its fry demand from the on-growing companies has doubled. At the same time, research studies on this species have increased and some studies concerning nutrition, larval rearing and its biochemical quality have been published (Roo *et al.*, 2010). However, there are no studies about genetic variation determination of economic traits, as previous step to develop genetic selection schemes on meagre.

Selection programs maximize the genetic response of different traits and farmers' benefits. However, there are few a selection schemes in fish in spite of their industrial production levels (Rye *et al.*, 2010), where different traits are considered as selection goals (growth rate, carcass quality, sexual maturity, resistance disease, etc.). Growth rate is the most important trait in fish breeding programs, being studied in different species (Neira *et al.*, 2004; Kolstad *et al.*, 2006; Powell *et al.*, 2008; Navarro *et al.*, 2009a; Vandeputte *et al.*, 2009; Saillant *et al.*, 2009; Kuukka-Anttila *et al.*, 2010; Nguyen *et al.*, 2010; Kause *et al.*, 2011). Growth rate is selected via weight at different ages, genetically correlated, allowing the possibility of early selection (O'Flynn *et al.*, 1999), and increases the accuracy of selection indexes (Falconer and Mackay, 1996). Moreover, the aquaculture market demands imposes the estimation of genetic variation of some critic life stages during the rearing period.



For genetic studies, the knowledge of relationships among fish, and the traceability of each fish during its rearing process are necessary. However, like other cultured species at commercial scale cultured species, meagre egg production is produced by mass spawning in order to preserve a sufficient quality, and to minimize manipulation and economic costs. This technique does not permit to establish neither a relationship knowledge nor a fish traceability, a limitation which was overcome combining genetic and physical markers (Navarro *et al.*, 2006, 2008; Soula *et al.*, 2012).

Microsatellites markers are useful tools in aquaculture research (Liu and Cordes, 2004), including genealogy inference. However, depending on the number of breeders and their inbreeding level, these genetic analyses costs could increase exponentially (Liu and Cordes, 2004). An effective method to reduce costs and genotyping errors is the develop of multiplex PCR (Olsen *et al.*, 1996; Neff *et al.*, 2000; Wesmajervi *et al.*, 2006; Navarro *et al.*, 2008), as described for different commercial species; rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) (Fishback *et al.*, 1999), Atlantic salmon (*Salmo salar*) (O'Reilly *et al.*, 1996), cod (*Gadus morhua*) (Delghandi *et al.*, 2003), cobia (*Rachycentron canadum*) (Pruett *et al.*, 2005; Renshaw *et al.*, 2006), brown trout (*Salmo trutta*) (Lerceteau-Kohler and Weiss, 2006), Senegalese sole (*Solea senegalensis*) (Porta *et al.*, 2006), silver carp (Gheyes *et al.*, 2009), gilthead seabream (*Sparus aurata*) (Navarro *et al.*, 2008; Borrell *et al.*, 2011), and red porgy (*Pagrus pagrus*) and redbanded seabream (*Pagrus auriga*) (Navarro *et al.*, 2008).

Within the *Scianidae* family, a significant number of microsatellites has been described (Turner *et al.* 1998; O'Malley *et al.*, 2003; Farias *et al.*, 2006; Ning *et al.*, 2007; Chang *et al.*, 2008; Karlsson *et al.*, 2008; Archangi *et al.*, 2009). Recently, 23 new microsatellite markers for meagre were published in the NCBI database by Porta *et al.*



(2010), which significantly increased the number of microsatellites to infer genealogy. The only published reference of multiplex PCRs in *Scianidea* family is in red drum (Renshaw *et al.*, 2006), describing six multiplex PCRs using 31 microsatellites, between 5 - 6 microsatellites in each PCR. Furthermore, these multiplex PCRs were elaborated looking for the best combination of primers with the same annealing temperature. Saillant *et al.* (2009) successfully used the same multiplex PCRs in a breeding program in juvenile red drum.

The aim of this study was heritability and genetic correlation estimation for growth traits in meagre at different ages, by using two new multiplex PCRs composed for a high number of polymorphic specific intra- and inter-specific microsatellite markers. This enabled to perform high quality pedigree and genetic variability studies.

IV.3. Materials and methods

IV.3.1. Biological sampling

A total of 577 individuals were analyzed: 76 breeders (38 females and 38 males) of a broodstock which was acclimated at the facilities of the Instituto Canario de Ciencias Marinas (ICCM, Canary Islands, Spain). Most of the individual were from a private company of Tenerife Island (Canary Islands, Spain); 475 descendants were obtained by mass spawning from these group of breeders; 19 descendants were from a broodstock of the Institut de Recerca i Tecnologia Agroalimentàries (IRTA, Tarragona, Spain), originally captured in the South coast of Portugal (Faro); and 7 individuals were wild specimens (5 fish from Egypt and 2 fish from Morocco coast).

The 475 descendants were tagged with *Passive integrated transponder* (PIT) at 120 days post hatch and reared till 446 days, when they were sacrificed. During this period,



the rearing density ranged between 6 and 13 kg/m³. Fish were fed with feed 62 of Ecolife (Proaqua® S.A.), according to the feed table provided by supplier (1.4% and 3% of fish biomass), three times per day.

Every 30 days, fish were sampled and weight and length were measured. Based in market interests, four sampling points were selected to be used for phenotypic and genetic analysis: 120 days post-hatch (DPH) was the tagging age with PIT tags, 150 DPH was the sale age to on-growing companies, 296 DPH was the final of winter period and 446 DPH was the slaughter age (harvest age). At 446 DPH age, fish fin were cut and preserved in absolute ethanol at room temperature. At the beginning of the study, 120 days, tagged fish were distributed in various tanks based on fish weight. Three groups were formed, and a significant difference between lots was detected for each sampling point (120, 150, 296 and 446 days).

DNA was extracted from a small piece of tail fin by following the phenol-chloroform method described by Sambrook *et al.* (1989), and then stored at 4°C in TE buffer (Tris 0.01 mM and 0.001 mM EDTA, pH 8.0). Quality and quantity of DNA were evaluated by using a Nanodrop 1000 spectrophotometer (Termo scientific®).

IV.3.2. Microsatellites

In this study, three steps were followed to establish the final design of multiplex PCR. Firstly, 49 microsatellite primer sets were initially tested carrying out temperature and magnesium screenings: 15 interspecific microsatellites which had been previously described in mullet (Archangi *et al.*, 2009); 11 in red drum (Turner *et al.*, 1998; O'Malley *et al.*, 2003); 1 in grey snapper (Farias *et al.*, 2006), and 22 intraspecific microsatellites described in meagre (Porta *et al.*, 2010). 10 samples were taken to



establish the optimum conditions for each marker. The genotypes were analyzed by 5% polyacrilamide electrophoresis (PAGE), for 2 hours ($1.3 \text{ W}\cdot\text{cm}^{-1}$). The gel was stained with Silver SequenceTM DNA Sequencing System (Promega) by following the recommendations of the manufacturer.

Secondly, only those markers that properly amplified (21 inter-specific and 15 intra-specific microsatellites) were redesigned and newly synthesized and tagged with fluorochromes. By using these microsatellites markers, 4 multiplex PCRs were designed, 2 inter-specifics (*meagre STR_PLEX A* and *meagre STR_PLEX B*), and 2 intra-specifics multiplexes (*meagre STR_PLEX C* and *meagre STR_PLEX D*).

Finally, 18 of that 36 initially redesigned microsatellite markers were discarded due to different causes; poor amplification, inappropriate allele size range or absence of polymorphisms. The remaining markers were combined in 2 robust multiplex reactions, one composed of 10 inter-specific microsatellites (STRi) and the other of 8 intra-specific microsatellites (STRs) (Table II.2). To make STRi and STRs, changes of fluorochromes and redesign of some primers were necessary.

IV.3.3. PCR conditions

PCR primers were redesigned to obtain 70 - 154 base pairs (bp) amplicon lengths. High complexity sequence was circumvented during primers redesign 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 180 mM salt concentration (K^+ , Na^+ , Tris^+ or NH_4^+). A 35–60% GC content of the primer sequence was ensured, to avoid the primer being sited on palindromes or homopolymers, such as poly (dT) with more than five bases. All primers candidates were analyzed for hairpin or secondary structures using the integrated



DNA technologies software (<http://www.idtdna.com/Scitools/Applications/mFold/>).

Primer stable secondary structures 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 chosen to ensure equal PCR amplification efficiency for all DNA fragments as previously described (Sánchez *et al.*, 2003).

Initially, each set of primers was tested individually on five DNA samples in order to corroborate a correct amplification, allele size range and microsatellite identification. Those microsatellite markers without individual amplification were discarded for the multiplex reaction.

Multiplex PCRs were optimized by following the recommendations of Navarro *et al.* (2008). An initial concentration of $0.2 \mu\text{M}$ of each primer was used. Primer concentrations were modified subsequently to obtain peak heights between 600 and 3000 of Relative Fluorescent Units (RFU) for each microsatellite marker. Firstly, primer sets of amplified markers with high RFU were reduced and later those with low RFU were increased. The total primer concentration was adjusted up to $0.7 \mu\text{M}$ at the end of set up. The final primer sets for STRi and STRs, and their features and concentrations are reported in Table II.2.

PCR conditions consisted of an initial denaturalization at 94°C for 10 min, followed by 30 cycles at 94°C for 30 s, 60°C for 1 min and 65°C for 1 min, with a final extension of 65°C for 60 min. Reactions were carried out in a final volume of $12.5 \mu\text{l}$ containing the following component concentrations: 1X *GeneAmp PCR Buffer II* (100 mM Tris-HCl pH 8.3, 500mM KCl) (Applied Biosystem[®]), 3mM MgCl_2 , 0.2 mM of each dNTP, $0.05 \mu\text{M}$ *AmpliTaq Gold DNA polymerase* (Applied Biosystem[®]), 12 ng of DNA template, and $0.01\text{--}0.06 \mu\text{M}$ of each primer.



After obtaining the optimal concentrations of microsatellite markers, all samples were amplified with STRi and STRs multiplexes in order to confirm each locus allelic segregation, to test genetic variability of all markers and to validate their effectiveness in determining the relatedness among fish.

Before running multiplex reactions on automatic sequencer, an aliquot of amplified products were checked on 2% agarose gel for 30 min ($8 \text{ v}\cdot\text{cm}^{-1}$) to assess the correct amplification of amplicons. Then, 1 μl of amplified products was mixed with 9.75 μl of Hi-Di formamide and 0.25 μl of *GeneScan 500-250 LIZ* (Applied Biosystem[®]) size standard, and run on *ABI Prism-3130-XL Genetic Analyzer* (Applied Biosystem[®]) with 36 cm capillary arrays and POP-4 polymer (Applied Biosystem[®]) (60°C , 3000v, 1500s). Electropherograms and genotypes were evaluated with GeneScan (v3.7) and Genotyper (v3.7) (Applied Biosystems, Inc.) softwares

IV.3.4. Data analysis

Hardy–Weinberg equilibrium test, the Exclusion Probability (EP) and the Combined Exclusion Probability (CEP) (both by parent pair option reported for Jamieson and Taylor, 1997), observed and expected heterozygosities, Polymorphic Information Content (PIC) and theoretical frequency of null alleles (Summers and Amos, 1996), were estimated with Cervus 3.0 (Kalinowski *et al.*, 2007).

Parental assignments between breeders and their descendants from ICCM were determined by using the exclusion method, and a non-commercial software provided by Vandeputte *et al.* (2006). Coancestry was calculated by using *Sofso* software (Fernández and González-Martínez, 2010), in the same fish.



All the data were tested for normality and homogeneity of variances, and then analyzed by using a General Linear Model, in order to detect facility and tank fixed effects: The software was SPSS (v. 19.0) (SPSS, Chicago, IL, USA). Then, variance components for body weight, length, and condition factor were estimated by Restricted Maximum Likelihood (REML) according to the following linear model:

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

Where y was the data recorded for the studied traits, β the fixed effect (tank) and u the random animal genetic effect. The model was resolved with the software package VCE (v. 6.2.0) (Kovač *et al.*, 2002). The magnitude of the estimated heritability was established, according to the classification of Cardellino and Rovira (1987).



IV.4. Results

IV.4.1. Multiplex PCRs

In general allele assignment was easy to perform, specifically in the STRs multiplex. Only the UBA53 marker of the STRi multiplex was difficult to read due to its peak shape (Figure IV.1 and IV.2). Two small artifact peaks were detected in STRi multiplex, one in the blue line at 123 bp, and the other in the green line at 115 bp, but they do not interfere during genotyping process. Incompatibility and overlapping peaks between amplified alleles were not detected.

IV.4.2. Genetic diversity parameters.

The parameters of genetic diversity estimated as number and range of alleles, heterozygosity, exclusion probability and Hardy–Weinberg equilibrium test for each microsatellite marker, in both multiplex PCRs, are shown in the Table IV.1.

The number of alleles in STRi and STRs multiplex ranged from 3 to 13, and the mean values of which were 6.6 for STRi and 7.6 for STRs. IRTA and wild group showed a higher mean number of allele (6.3 for STRs and 6.1 for STRi) than broodstock from ICCM (5.3 for STRs and 3.9 for STRi). STRi showed a mean expected heterozygosity of 0.61 and a combined exclusion probability (CEP) of 0.99. The highest heterozygosity of which was observed in *CacMic14 locus*, and the highest exclusion probability (EP) for UBA53 *locus*. In the STRs multiplex, mean expected heterozygosity and CEP were 0.60 and 0.99, respectively, with the highest heterozygosity and EP observed in *GA2b locus*.

The mean values of polymorphic information content (PIC) were 0.56 for both multiplexes. For STRi, PIC values ranged between 0.24 (UBA853) and 0.79 (UBA53), while for STRs ranged between 0.25 (GCT15) and 0.83 (GA2b).

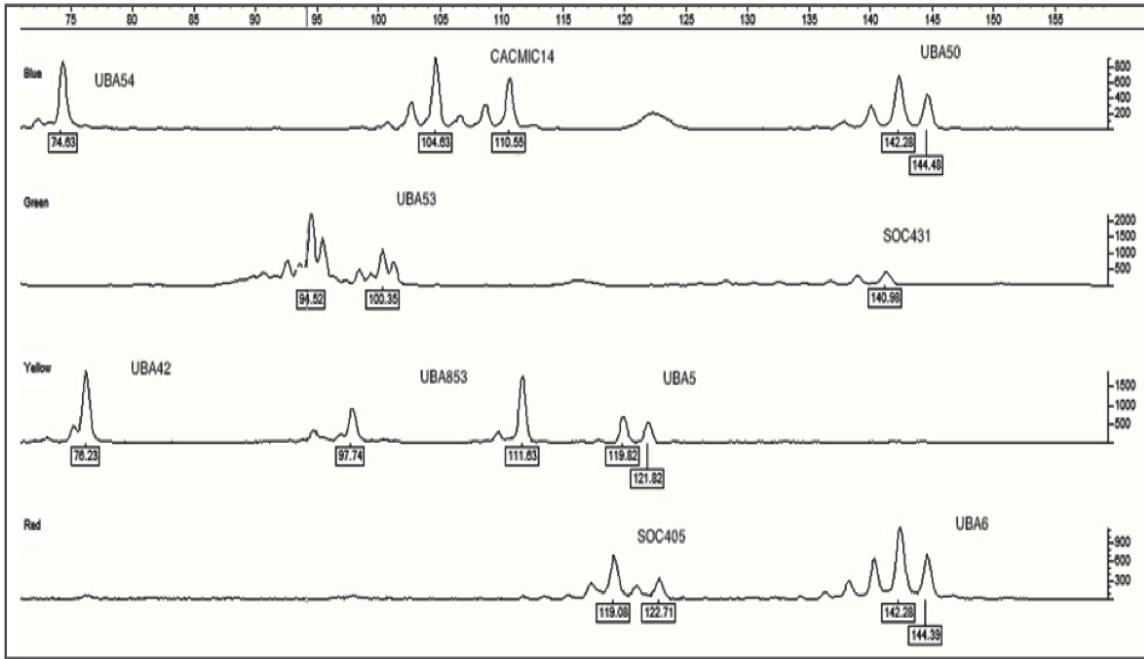


Figure IV.1. Example of electropherogram for the inter-specific multiplex PCR (STR).

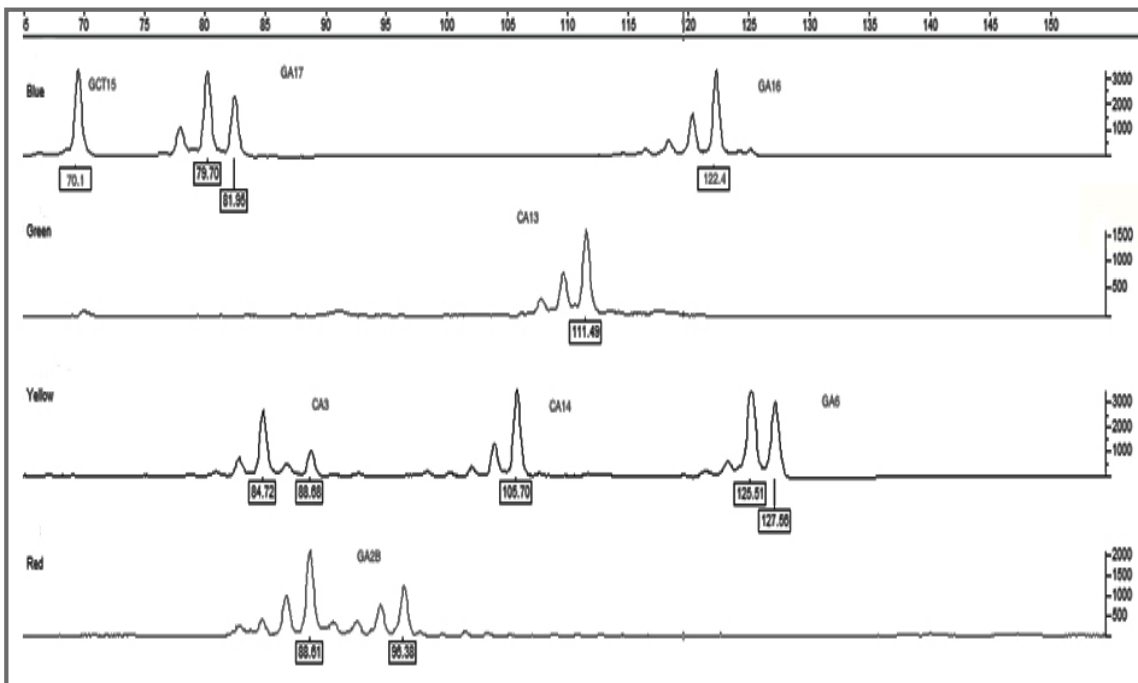


Figure IV.2. Example of electropherogram for the specific multiplex PCR (STRS).



Six *loci* in each multiplex were not in Hardy–Weinberg equilibrium, after the Bonferroni correction, and they had a high number of alleles. The theoretical frequencies of null alleles ranged from -0.14 (UBA6) to +0.17 (UBA54) (mean value 0.01) for STRi, and from -0.06 (GA2B) to 0.26 (GA16) (mean value -0.06) for STRs. The only *locus* where null alleles were detected by familial segregation in ICCM fish was UBA53 (with a real frequency of 0.19).

The mean coancestry value among ICCM breeders was high (0.41), and ranged from 0.17 to 0.71 for each marker.

IV.4.2. Parental assignment

The pedigree reconstruction for breeders and descendants of ICCM fish was executed, and a low rate of parental assignment was achieved by using each multiplex PCR (12 % for STRi and 8.7 % for STRs) separately. Using both multiplex PCRs, 77.7 % of descendants was assigned to a single parental pair, 23.15% assigned to two pairs of potential parents and only 1.68% was not assigned. The same data showed that 22 dams and 21 sires, out of the 76 breeders, contributed to the spawn. A total of 44 full-sib families were represented in the 476 offspring sample. However, 423 descendants were used in the genetic analysis, 62 descendants with only one parent correctly assigned and 361 previously assigned to one parent pair.

IV.4.2. Growth trait

Growth rate was high during the first four months after tagging, and decreased considerably during winter period. Condition factor showed a decreasing tendency from 120 to 446 DPH (Table IV.2).



TABLE IV.1. BODY WEIGHT, NUMBER OF ALLELES (K), ALLELE SIZE RANGE IN BP (RANGE), OBSERVED (H_{obs}), EXPECTED (H_{exp}) HETEROZYGOSITY, EXCLUSION PROBABILITY (EP) AND HARDY-WEINBERG EQUILIBRIUM TEST (HW) IN STR1 AND STRs MULTIPLEX REACTIONS.

STR1	Total samples										ICCM Breeders				IRTA and wild fish			
	Range	K	HObs	HExp	EP	HW	k	HObs	HExp	HExp	k	HObs	HExp	HExp	HExp	HExp		
UBA 50	127-153	10	0.728	0.717	0.703	S	6	0.697	0.632	0.632	9	0.815	0.850	0.850	0.850	0.850		
Cac mic 14	101-117	8	0.893	0.790	0.781	S	6	0.908	0.755	0.755	6	0.852	0.810	0.810	0.810	0.810		
SOC405	113-125	5	0.641	0.621	0.507	S	3	0.671	0.621	0.621	5	0.556	0.602	0.602	0.602	0.602		
UBA6	132-154	10	0.796	0.639	0.593	S	5	0.816	0.579	0.579	10	0.741	0.772	0.772	0.772	0.772		
SOC 431	123-155	8	0.636	0.586	0.539	NS	4	0.684	0.530	0.530	8	0.478	0.717	0.717	0.717	0.717		
UBA 5	120-124	3	0.670	0.647	0.5	NS	3	0.763	0.634	0.634	3	0.407	0.514	0.514	0.514	0.514		
UBA 54	74-78	3	0.340	0.476	0.281	S	2	0.303	0.457	0.457	3	0.444	0.523	0.523	0.523	0.523		
UBA 53	86-120	13	0.592	0.817	0.822	S	6	0.605	0.757	0.757	11	0.545	0.883	0.883	0.883	0.883		
UBA853	92-112	3	0.291	0.258	0.221	NS	2	0.250	0.220	0.220	3	0.407	0.350	0.350	0.350	0.350		
UBA42	70-76	3	0.396	0.528	0.367	NS	2	0.487	0.493	0.493	3	0.120	0.553	0.553	0.553	0.553		



TABLE IV.1. BODY WEIGHT. NUMBER OF ALLELES (K), ALLELE SIZE RANGE IN BP (RANGE), OBSERVED (H_{obs}), EXPECTED (H_{exp}) HETEROZYGOSITY, EXCLUSION PROBABILITY (EP) AND HARDY-WEINBERG EQUILIBRIUM TEST (HW) IN STRI AND STRs MULTIPLEX REACTIONS (CONTINUATION).

STRs	Total samples							ICCM Breeders				IRTA and wild fish			
	Range	K	HObs	HExp	EP	HW	k	HObs	HExp	k	HObs	HExp	k	HObs	HExp
CA 13	90-118	13	0.865	0.819	0.818	S	7	0.833	0.773	11	0.958	0.880			
GA 2b	84-110	11	0.947	0.848	0.857	S	7	1.000	0.786	5	0.783	0.533			
CA14	101-115	5	0.548	0.724	0.637	S	3	0.611	0.669	4	0.333	0.679			
CA 3	80-106	12	0.490	0.588	0.597	S	3	0.361	0.300	12	0.875	0.884			
GCT15	70-80	4	0.312	0.277	0.217	NS	2	0.264	0.231	4	0.476	0.426			
GA17	80-102	7	0.600	0.677	0.646	S	4	0.552	0.593	6	0.846	0.671			
GA16	116-126	6	0.400	0.722	0.646	S	3	0.403	0.653	6	0.308	0.612			
GA6	128-132	3	0.144	0.127	0.118	N	2	0.167	0.154	2	0.056	0.056			



IV.4.2. Heritabilities and correlations

Phenotypic correlation of weight between 446 DPH and different ages showed an increased correlation from 0.42 for 120 DPH to 0.78 for 296 DPH. The same tendency was detected with respect to different length correlation. However, genetic correlation between different weights and different lengths were high (> 0.75). Furthermore, phenotypic and genetic correlation between weight and length at each sampled point was high (> 0.88).

Condition factors showed low phenotypic correlations with weight and length of its respective sampled points. This data contrast with the different genetic correlations reported in the Table IV.3.

Heritabilities were low to moderate and ranged between 0.01 and 0.19. Higher heritabilities were observed in 296 and 446 DPH sampled points. Also, in the majority of cases, lower heritabilities were observed in condition factor respect to weight and length.

TABLE IV.2. WEIGHT, LENGTH AND CONDITION FACTOR (K) FOR MEAGRE AT 4 DIFFERENT AGES FOR MEAGRE.

DPH	weight (g)	length (cm)	K (g cm ⁻³)
120	14.31±7.38	10.00±1.57	1.36±0.17
150	29.14±0.52	12.98±1.73	1.27±0.17
296	190.69±75.64	24.85±3.52	1.17±0.09
446	583.98±180.71	37.04±4.3	1.11±0.12



TABLE IV.3. HERITABILITIES (IN THE DIAGONAL, WITH \pm STANDARD ERROR) PHENOTYPIC CORRELATIONS (ABOVE THE DIAGONAL) AND GENETIC CORRELATIONS (IN ITALICS BELOW THE DIAGONAL, WITH \pm STANDARD ERROR) BETWEEN BODY WEIGHT, FORK LENGTH AND CONDITION FACTOR (CF).

mix	Weight 120	Length 120	CF120	Weight 150	Length 150	CF150	Weight 296	Length 296	CF 296	Weight	Length	CF
Weight 120	0.08\pm0.06	0.96	-0.14	0.68	0.69	-0.12	0.48	0.52	-0.01	0.42	0.45	-0.15
Length 120	<i>0.95\pm0.07</i>	0.07\pm0.06	-0.42	0.63	0.66	-0.15	0.5	0.49	-0.06	0.37	0.42	-0.19
CF 120	<i>0.11\pm0.62</i>	<i>0.18\pm0.66</i>	0.10\pm0.09	-0.05	-0.1	0.17	-0.03	-0.05	-0.46	0.04	-0.17	-0.28
Weight 150	<i>0.91\pm0.17</i>	<i>0.79\pm0.31</i>	<i>0.50\pm0.54</i>	0.08\pm0.07	0.95	0.04	0.66	0.71	0.06	0.59	0.62	-0.17
Length 150	<i>0.77\pm0.22</i>	<i>0.83\pm0.35</i>	<i>0.72\pm0.48</i>	<i>0.98\pm0.03</i>	0.05\pm0.06	-0.25	0.7	0.7	0.01	0.58	0.62	-0.19
CF 150	<i>0.49\pm0.67</i>	<i>0.52\pm0.72</i>	<i>-0.33\pm0.85</i>	<i>0.80\pm0.67</i>	<i>0.73\pm0.93</i>	0.03\pm0.03	-0.07	-0.08	0.13	-0.03	-0.07	-0.05
Weight 296	<i>0.71\pm0.29</i>	<i>0.55\pm0.04</i>	<i>0.41\pm0.42</i>	<i>0.77\pm0.25</i>	<i>0.90\pm0.27</i>	<i>0.94\pm0.16</i>	0.16\pm0.09	0.97	0.15	0.78	0.8	-0.22
Length 296	<i>0.59\pm0.34</i>	<i>0.43\pm0.41</i>	<i>0.39\pm0.45</i>	<i>0.94\pm0.15</i>	<i>0.83\pm0.80</i>	<i>0.96\pm0.10</i>	<i>0.88\pm0.13</i>	0.19\pm0.10	-0.03	0.78	0.84	-0.28
CF 296	<i>-0.42\pm1.18</i>	<i>-0.51\pm1.52</i>	<i>-0.77\pm0.15</i>	<i>-0.64\pm0.42</i>	<i>-0.53\pm0.62</i>	<i>-0.79\pm1.46</i>	<i>-1.00\pm0.08</i>	<i>-0.55\pm0.43</i>	0.01\pm0.07	0.1	-0.01	-0.08
Weight	<i>0.91\pm0.24</i>	<i>0.99\pm0.30</i>	<i>0.29\pm0.48</i>	<i>0.75\pm0.17</i>	<i>0.89\pm0.17</i>	<i>0.89\pm0.32</i>	<i>0.95\pm0.12</i>	<i>0.96\pm0.08</i>	<i>-0.53\pm0.58</i>	0.13\pm0.08	0.95	-0.06
Length	<i>0.81\pm0.30</i>	<i>0.79\pm0.36</i>	<i>0.09\pm0.55</i>	<i>0.88\pm0.18</i>	<i>0.76\pm0.34</i>	<i>0.37\pm0.58</i>	<i>1.00\pm0.01</i>	<i>0.82\pm0.33</i>	<i>-0.70\pm0.47</i>	<i>0.96\pm0.04</i>	0.13\pm0.07	-0.31
CF	<i>0.30\pm0.56</i>	<i>0.03\pm0.6</i>	<i>0.99\pm0.28</i>	<i>0.08\pm0.59</i>	<i>0.34\pm0.68</i>	<i>-0.65\pm0.61</i>	<i>-0.21\pm0.48</i>	<i>-0.22\pm0.44</i>	<i>0.95\pm0.42</i>	<i>0.13\pm0.46</i>	<i>-0.14\pm0.47</i>	0.13\pm0.07



IV.5. Discussion

IV.5.1. Multiplex PCRs and genetic variation

In this study, the cross-amplification of *Scianidae* family markers in multiplex PCRs showed that 71% of redesigned inter-specific microsatellites amplified in meagre and 53% of which were used in the STRi multiplex PCR. This data confirms that regions flanking microsatellite markers are conserved among these closely related species (Presa and Guyomard, 1996; Rogers *et al.*, 2004). These results are in accordance with data published by Navarro *et al.* (2008), who redesigned two multiplex PCRs with inter-specific microsatellites, the 85% of which successfully amplified in gilthead seabream, the 65% in redbanded seabream, and the 60% in red porgy.

To reach a successful parental assignment at a low cost, we combined only half of the initial 36 redesigned microsatellites to construct the final multiplex assays. These data are comparable with results observed in brown trout, where 12 from 43 initial microsatellites were used (Lerceteau-Kohler and Weiss, 2006), and in Senegalese sole, where only five markers from 12 microsatellites were used in the multiplex Porta *et al.* (2006). Our multiplex assays included ten inter-specific microsatellites, and they are the first reported for meagre. In the majority of multiplex PCRs in fish, the mean number of markers is six (Delghandi *et al.*, 2003; Porta *et al.*, 2006; Lerceteau-Kohler and Weiss, 2006; Reanshwa *et al.*, 2006; Johnson *et al.*, 2007; Saillant *et al.*, 2009; Gheyès *et al.*, 2009), which is lower than the minimum number of markers included in each multiplex PCRs of this study.

Regarding the fish groups studied, the high heterozygosity, PIC and number of alleles observed in the STRi and STRs multiplex PCRs, reveal an acceptable efficiency to assess genetic variability parameters in meagre. These data are consistent with those found in



broodstock of other aquaculture species (Launey *et al.*, 2003; Brown *et al.*, 2005; Navarro *et al.*, 2008).

The presence of a high number of markers in Hardy–Weinberg disequilibrium can be explained by the origin of both fish groups. In fact, the observed number of alleles and heterozygosity of the IRTA and wild groups were higher than the observed in the breeders of ICCM that were reared in captivity. Thus, Martínez-Rodríguez *et al.* (1998) observed a decreasing of polymorphism index up to 31% of heterozygosity in a seabass (*Dicentrarchus labrax*) broodstock coming from breeders reared in captivity. Similarly, Alarcón *et al.*, (2004) observed a significant reduction in the number of alleles of genotyped microsatellites in farmed versus wild gilthead seabream.

On the other hand, in the genetic characterization process, there are genotyping errors such as the incidence of null alleles due to mutations within a primer site (Wagner *et al.*, 2006), which could be increased by using inter-specific markers (Primmer *et al.*, 1995; Jarne and Lagoda, 1996; Navarro *et al.*, 2008). In this study, the number of markers with positive theoretical frequency of null alleles was higher in the STRI multiplex than in STRS multiplex. In addition, this frequency was higher in markers with lower molecular weights. This can be explained by the differential amplification of size variant alleles (Wattier *et al.*, 1998), due to the competitive nature of multiplex PCR, alleles of short length often amplify more efficiently than larger ones (Dakin and Avise, 2004). The presence of null alleles can produce a badly biased estimation of relatedness and parental assignments. Even when null alleles are at a low frequency, they can have a great impact. In fact, when the null allele detected in the UBA53 marker (STRI multiplex) was recognized and manually recoded, the parent assignment for this marker increased by 50%.



IV.5.2. Parent assignment

In this study of farmed broodstock families, a 77.7% success in parent assignments was obtained by using 17 markers from 18 amplified in both multiplex, since this percentage did not increase when the GCT15 marker was added. This high number of loci is in concordance with the 10 to 15 (from 3 to 23 allele numbers) markers suggested by Saillant *et al.* (2009) to achieve a robust assignment in red drum when using the simulation method. However, this data contrast with the 7 *loci* described in gilthead seabream to assign 100% descendents to a single parent pair (Navarro *et al.*, 2008), and with the 5-10 markers used in species such as silver carp (Gheyes *et al.*, 2009), Senegalese sole (Porta *et al.*, 2006) and brown trout (Johnson *et al.*, 2007), the parental assignment of which showed a success range from 96 to 99%.

The impossibility of assigning 100% of individuals can be explained by the broodstock origin, as they came from the same company located on Tenerife (Canary Islands), and it was reported that the majority of breeders were from the same lot of descendents. In fact, coancestry of this breeder broodstock showed a high consanguinity among breeders. These values are quite high compared to those published for marine fish in captivity. Fuentes *et al.* (2004) in Senegalese sole (*Senegalis sole*) found a coancestry mean value of 0.39 using only 3 microsatellite markers. While, in gilthead seabream the coancestry values ranged from 0.12 to 0.29 (Launey *et al.*, 2003; Brown *et al.*, 2005).

IV.5.3. Growth

Meagre is a species with a high growth rate independently of the on-growing system. In this study, meagre showed a decrease of growth rate from the first month post tagging to the final rearing period. Cardenas (2010) observed the same data in a review of meagre breeding techniques, affirming that SGR begging with values of 20% days in larvae



rearing period, decreasing to 3-5%/days between 50 and 130 DPH and in the final growing period the SGR was 1%/ day. In the same way, fish condition factor decreased significantly during the rearing period. This data demonstrated that meagre gained more weight than length in the first phase of growth and was altered during the later period of growth. The changes in condition factor during the year may be due to changes in nutritional status of the fish (Chatzifotis *et al.*, 2010) and can be affected by fish form, maturity and age, and environment (Navarro *et al.*, 2009a).

IV.5.4. Heritabilities and growth correlation

Low heritabilities observed in this study can be attributed to the low genetic diversity of the breeder broodstock, which has been previously explained. Meaning that most of the variance for traits is due to environmental variances and that the contribution of genetic variation is moderate to low. This data are in concordance with the heritability observed at harvest body weights ranging from 0.1 to 0.2 over all year classes in Atlantic code (Quinton *et al.*, 2005). However, higher heritabilities were observed in many other species (Gjerde *et al.*, 2004; Saillant *et al.*, 2006; Vandeputte *et al.*, 2009; Navarro *et al.*, 2009a; Kuukka-Anttila *et al.*, 2010; Nguyen *et al.*, 2010).

As it has been observed in other studies, heritabilities of weight and length for each age were similar (Dupont-Nivet *et al.*, 2008; Navarro *et al.*, 2009a; Nguyen *et al.*, 2010). This data corroborate especially with the high phenotypic and genetic correlation between this two traits and the significant repeatability between individuals of the same family. For this reason, the presence of one of the two traits is sufficient in a selecting breeding scheme. Nevertheless, in this election, it is imperative to take into account some correlations with other economic traits.



The difference between heritabilities of weight and length with respect to a same trait in different ages is little important and does not exceed the 0.06. In gilthead seabream (Navarro *et al.*, 2009a) and in European White fish (Kause *et al.*, 2011) similar differences between tagging weight and slaughtered weight were observed, showing little variation in heritability for growth traits from early life stages. In this study, this data was confirmed by the high genetic correlation between weight at different ages and between their respective lengths, which can help us to confirm the possibility of a selection process for weight and length from earlier ages. This means an important economic cost reduction in selecting breeding program focused on growth traits.

Respect to condition factor, low heritabilities observed in different ages are similar than the exposed by Saillant *et al.* (2009) in seabass at harvest weight, and by Navarro *et al.* (2009a) in gilthead seabream at different ages. The lack of a clear tendency of heritability between ages is due to the nature of this trait. As previously explained, condition factor is a crude measure of energy reserves level and fish health (Goede and Barton, 1990), it depends on many other environmental and physiological factors. Condition factor reflects a punctual period for growth, that intermediate point help us to know the fish attitude but cannot be used like a definitive measure. Furthermore, the variability of correlation between condition factor versus weight and length for each age and the high standard error of this data imposed a conservative attitude and the exclusion of this trait in a selection breeding program from early age

IV.6. Conclusion

In this study, for the first time, heritability and genetic variation of growth trait on meagre were reported by using two new inter- and intra-specific multiplex PCRs. These multiplexes showed their usefulness in pedigree reconstruction under industrial



conditions, even when using high-inbreeding coefficient broodstocks. Heritabilities and genetic correlation suggest the possibility of conducting direct-selection breedings on growth by using only weight or length and since early ages.

IV.7. Acknowledgement

Authors thank the help and the effort of technicians from Instituto Canario de Ciencias Marinas and Grupo de Investigación en Acuicultura, M Martel and G. Alejandro. We also acknowledge the Agencia Española de Cooperación Internacional (AECI). This study was supported by a Canary Islands Government Project (PI-2007/052).



MICROSATELLITE PCRs

Estimates of heritabilities and genetic correlations for growth and carcass traits in meagre (*Argyrosomus regius*), under industrial conditions



V. Estimates of heritabilities and genetic correlations for growth and carcass traits in meagre (*Argyrosomus regius*), under industrial conditions

V.1. Abstract

In this study were estimated heritabilities and genetic correlation for and between morphologic traits (by using image analysis) and carcass traits of commercial interest in meagre (*Argyrosomus regius*) cultured under industrial conditions and considering it is sold for weights higher than 1 kg. A total of 59 full-sib families from 25 males and 22 females of meagre were reared in different locations and under industrial conditions. For the first time heritabilities, phenotypic and genetic correlation for growth and carcass traits were estimated using 1185 fish from an industrial stock. Pedigrees were redrawn using two multiplex PCRs composed by 18 intra-specific and inter-specific microsatellites described by Soula *et al.* (2011). The heritability estimates at harvest were 0.22 ± 0.12 for weight were, 0.19 ± 0.11 for length, 0.09 ± 0.08 for condition factor, 0.15 ± 0.09 for fillet weight, 0.23 ± 0.11 for gutted weight, low-medium for morphologic and cardio-respiratory traits. High and positive correlations between growth and carcass traits were observed. High and positive correlations were detected between growth and carcass traits versus morphologic traits analyzed by using MATLAB software. Additionally, a medium heritability of ventricular weight was observed (0.20 ± 0.11). High and positive genetic correlations for the growth versus cardio-respiratory traits (ventricular and gill weights) were detected (> 0.9), while high and negative genetic correlations were estimated for growth traits versus both cardio-respiratory in percentage suggested correlated selection for the growth traits in this species. These data suggest that



body weight and length can be improved by direct selection or indirect selection through morphologic traits by image process technique, due to the higher heritability of them. Furthermore, a positive and indirect selection of economic traits such as fillet weight and gutted body weight would be produced.

Keywords: meagre, *Argyrosomus regius*, heritability, growth, carcass, morphologic, cardio-respiratory, image process.



V.2. Introduction

Nowadays, when the fragile economy forces factories to fight to escape from crisis, the continuity of aquaculture farms depends on getting the most profitability, so, they opt for different strategies, such as the use of advanced technologies and the introduction of new species (Fotedar and Philips, 2011). These two strategies aims are to get a rapid growth at the lowest cost, an acceptable morphology and a similar to wild fish or attractive colour.

The rapid growth of meagre (*Argyrosomus regius*) makes that fish a potential alternative species for aquaculture diversity in the Mediterranean Sea (Pastor *et al.*, 2002; Poli *et al.*, 2003). The increases of meagre production during the last five years consolidate this alternative (APROMAR, 2011). Furthermore, the area of improvement of this specie is still very important, and many studies, including nutrition (Chatzifotis *et al.*, 2010, Martínez-Llorens *et al.*, 2011), reproduction and management (El-Shelby *et al.*, 2007; Serezli *et al.*, 2011), and breeding technique protocols (Roo *et al.*, 2010) were developed.

The domestication process is too important for the improvement and the increase of the production efficiency. Though, selective breeding can deliver a more remarkable gain and increase biological productivity (Fjalestad *et al.*, 2003, Gjedrem and Baranski, 2008). In various species, results of selection response showed an increase of above 10% per generation (Gjedrem, 2000) and, most of these cases, growth traits improvement had been the initial focus.

Moreover, meagre shows a good perspective in the processing industry due to the high percentage dressing and percentage fillet with respect to other aquaculture species (Poli *et al.*, 2003, Grigorakis *et al.*, 2011). To account for this potential future marketing strategy,



it is necessary to evaluate the processed traits (guttled and fillet weights and percentages) in a selection program, as it has been previously realised in genetic studies of gilthead seabream (Navarro *et al.*, 2009a), common carp (Kocour *et al.*, 2007) and European whitefish (Kause *et al.*, 2007). Furthermore, other traits like ventricular and gill weights may be estimated as they are closely related to growth traits.

To ameliorate the hard and expensive technique involved for sampling methods, image analysis permits the recording of linear and area trait (dimensional measurements) of carcass in an objective and automated way, providing a fast and very reliable source of information for genetic improvement programs. This technique was successfully used in other animal breeding programs (Osawa *et al.*, 2008; Rius-Vilarrasa *et al.*, 2009, 2010).

The estimation of genetic parameters can be especially difficult in fish species with a mass-spawning system and when individuals from all family are mixed in the same tanks to homogenize environmental conditions (Castro *et al.*, 2008; Navarro *et al.*, 2009a). Although the physical tag (Soula *et al.*, 2009) and gene technology based on polymorphic microsatellites opens new opportunities to understand the nature of the genetic variation underlying production traits (Fjalestad *et al.*, 2003).

Combining physical tagging system and molecular marker, the aim of this study was to estimate heritabilities and genetic correlations for growth and carcass traits at harvest sizes from a commercial meagre broodstock, and to assess the usefulness of image analyses in genetic improvement.



V.3. Materials and methods

V.3.1. *Breeding conditions and traits*

In May 2006, a stock of 140 meagre was acquired from an offshore farm located on the island of Tenerife (Canary Islands, Spain), then, they were transferred to facilities of the Instituto Canario de Ciencias Marinas (ICCM) (Gran Canaria, Canary Islands). Fishes were kept in 10 m³ tanks. Once acclimatized, on July 2006, fishes were identified with a microchip. Fish were fed a ration of 1% of their biomass, with a commercial diet (Proaqua® S.A., 10 mm).

In April 2008, 76 breeders were induced with 15 µg.kg⁻¹ GnRH dose. Eggs from mass spawn were collected and larval rearing was conducted at ICCM in mesocosm facilities, following the protocol that had been previously predefined by Roo *et al.* (2010).

At 150 days fingerlings were divided in three lots distributed in different sites in the offshore farm of the company Canarias de Explotaciones Marinas S.L. (CANEXMAR), in the up-growing installations of the company Alevines y Doradas S.A (ADSA) and 1000 fish in the facilities of ICCM. These fish were tagged with *Passive Integrated Transponder* (PIT) and reared until 446 days, sacrifice date. During this period, the density ranged between 6 and 13 kg/m³. Throughout the culture facilities, ICCM fish have been fed with Ecolife feed from Proaqua® S.A. and following the table of that company with a variation of feed rate between 1.4 and 3% of the biomass. The stock was fed three times per day.

At harvest size (446 days post-hatch), 477 fish from ICCM (477 fish), and samples from CANEXMAR (310 fish) and from ADSA (400 fish) were slaughtered. Digital photos were taken and some morphologic traits (Max head width, fin width, max dorsal



width, max fillet width, max width, dorsal area, fillet area, total area, head length, dorsal length, fillet length and total length) were analyzed with MATLAB software (Figure V.1). Body weight, fork length and gutted body weight were measured. Fish were manually skinned and filleted without including the nape and the belly flap. Heart and gills were weighed. Both fillets were weighed together. Derived traits were also calculated as follows: condition factor (K) ($100 \times \text{body weight} \times \text{fork length}^{-3}$), dressing percentage ($100 \times \text{gutted body weight} \times \text{body weight}^{-1}$), fillet percentage ($100 \times \text{fillet weight} \times \text{body weight}^{-1}$), heart percentage ($100 \times \text{heart weight} \times \text{body weight}^{-1}$) and gills percentage ($100 \times \text{gills weight} \times \text{body weight}^{-1}$).

V.3.2. Genotyping and parental assignment

1185 offspring and 76 breeders were genetically characterized using 18 microsatellites markers designed in two multiplexes. A fragment of the caudal fin was preserved in 1 ml of absolute ethanol until DNA extractions. DNA was extracted by following the phenolchloroform method (Sambrook *et al.*, 1989). DNA was stored at 4°C in 50 µl of TE 1X solution. Amplification, running and reading conditions for the microsatellite markers are described in Soula *et al.* (2011). Familial assignments for meagre broodstock of unknown gender were determined by the exclusion method using a non-commercial software provided by Vandeputte *et al.* (2006).

V.3.2. Statistical model

All data were tested for normality and homogeneity of variances, and analyzed using a General Linear Model, in order to detect the effects of facility and tank, using SPSS (v. 19.0) (SPSS, Chicago, IL, USA). Subsequently, variance components for body weight, fork length, condition factor, gutted body weight, fillet weight, dressing percentage, fillet



percentage, heart weight, percentage and gill weight were estimated by Restricted Maximum Likelihood (REML) according to the following linear model:

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

where y was the data recorded for the studied traits, β the fixed effects (facility and tank) and u the random animal genetic effect. The model was resolved with the software package VCE (v. 6.2.0) (Kovač *et al.*, 2002). The magnitude of estimated heritability was established according to the classification of Cardellino and Rovira (1987).

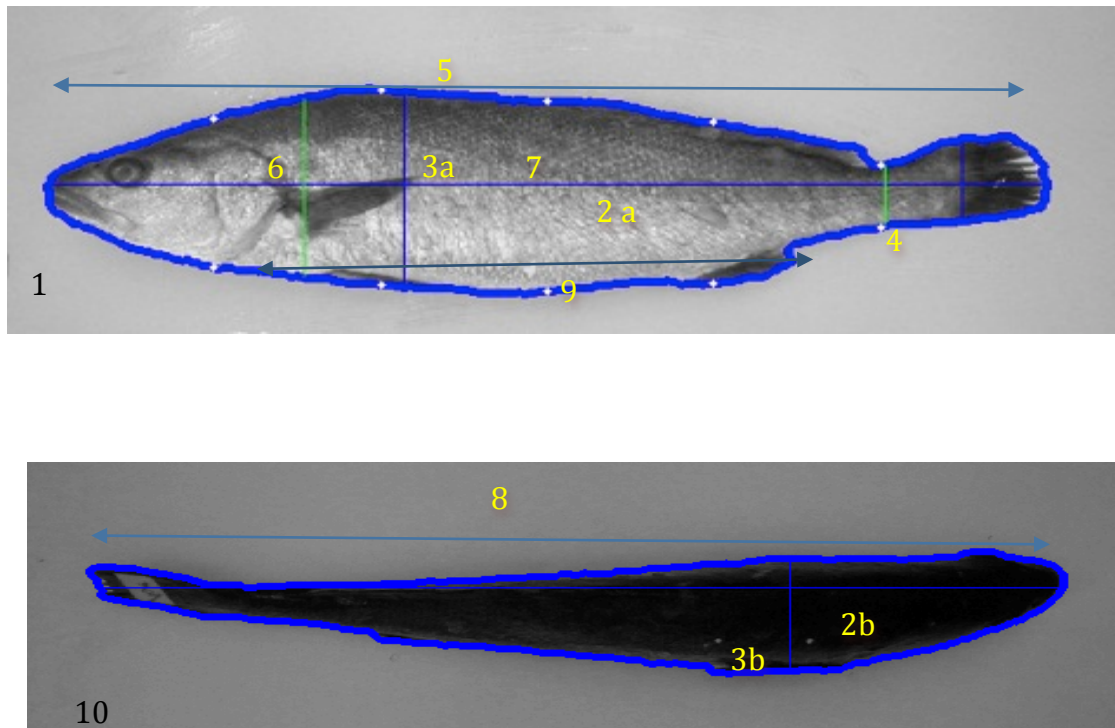


Figure V.1. Analyzed image traits for meagre (*Argyrosomus regius*) total area (1), total length (2a), dorsal length (2b), max dorsal width (3a), max width (3b), fin width (4), head-fin length (5), max head width (6), area fillet (7), standard length (8), max fillet length (9) and dorsal area (10).



V.4. Results

V.4.1. Pedigree reconstruction

In the parental assignment, using the exclusion method with no tolerated error parentage, the application of the two multiplex PCRs assigned 82.8% of descendants to single pair parents. The results showed the existence of 59 full-sib families, with 16.5 descendants per family and the contribution of 22 dams and 25 sires for the totality of the assigned fish.

Among the 1185 offspring, 975 were assigned to a single parent pair, and 102 were assigned to several parental pairs. From this group, 95 unique parents were recovered for the analysis, so 1070 fishes were used to get estimates in VCE program.

V.4.2. Growth and carcass traits

Statistical differences in body weight, length, gutted weight and fillet weight, at harvest age, were found among the three facilities, being observed higher data in CANEXMAR (Table V.1). Condition factor was the only parameter that did not show any statistically significant difference among facilities. .

Concerning morphologic traits, the total mean of total area, total length, max width, and filet area were 299.93 ± 73.5 , 41.53 ± 5.11 , 10.19 ± 1.99 and 211.28 ± 53 , respectively. As expected, a significant statistical difference was stuck out in all of morphological data, thus, supporting the growth superiority aspect of CANEXMAR fish. All data of image traits are resumed in Table V.2.



TABLE V.1. GROWTH AND CARCASS TRAITS (MEAN \pm STANDARD DEVIATION) IN THE THREE FACILITIES FOR ON-GROWING MEAGRE.

Trait	ICCM	ADSA	CANEXMAR
Body weight (g)	583.98 \pm 8.27 ^a	817.33 \pm 10.42 ^b	1105.53 \pm 18.39 ^c
Body length (cm)	37.04 \pm 0.19 ^a	40.9 \pm 0.18 ^b	45.68 \pm 0.29 ^c
Condition factor (g/cm ³)	1.11 \pm 0.00	1.17 \pm 0.00	1.16 \pm 0.04
Gutted body weight (g)	519.9 \pm 7.34 ^a	729.38 \pm 9.48 ^b	970.78 \pm 14.39 ^c
Fillet weight (g)	219.53 \pm 3.48 ^a	342.09 \pm 5.19 ^b	436.25 \pm 7.94 ^c
Dressing percentage (%)	89.05 \pm 0.08	89.41 \pm 0.26	88.38 \pm 0.37
Fillet percentage (%)	37.23 \pm 0.15 ^a	41.54 \pm 0.21 ^c	39.37 \pm 0.21 ^b

Value within each row not sharing the same letter are significantly different (P<0.05).

V.4.2. Heritabilities and correlations for growth and carcass traits

All correlations and heritabilities are resumed in Table V.3. Heritabilities of weight, length, fillet weight and gutted weight were medium (ranged 0.15-0.23; Table 11). On the contrary, heritabilities of the condition factor, dressing percentage and fillet percentage were very low (less 0.09). As expected, the higher heritability for sampled data was observed in gutted weight and in body weight. The lower heritability was detected in fillet %. In general, heritabilities were moderate for morphologic traits and higher (0.14 and 0.26) than growth traits, except for dorsal length (0.08).



GROWTH TRAITS HERITABILITIES

TABLE V.2. ANALYZED IMAGE TRAITS (MEAN ± STANDARD DEVIATION) FOR MEAGRE IN THE DIFFERENT THREE FACILITIES.

Trait	ICCM	ADSA	CANEXMAR
Total area (cm ²)	255.45±2.78 ^a	299.32±2.67 ^b	365.81±3.73 ^c
Total length (cm)	38.58±0.21 ^a	41.26±0.18 ^b	46.20±0.21 ^c
Max width (cm)	9.17±0.05 ^a	10.52±0.05 ^b	11.24±0.07 ^c
Fin width (cm)	3.16±0.02 ^a	3.21±0.01 ^b	3.56±0.02 ^c
Head-fin length (cm)	31.91±0.17 ^a	34.47±0.14 ^b	38.31±0.17 ^c
Head width (cm)	8.17±0.04 ^a	8.80±0.04 ^b	9.78±0.05 ^c
Fillet area (cm ²)	177.70±1.99 ^a	214.69±2.03 ^b	255.85±2.87 ^c
Standard length (cm)	34.93±0.19 ^a	37.78±0.16 ^b	42.13±0.2 ^c
Max filet length (cm)	22.98±0.14 ^a	24.86±0.12 ^b	27.58±0.16 ^c
Max dorsal width (cm)	9.18±0.05 ^a	10.51±0.05 ^b	11.24±0.07 ^c
Dorsal total area (cm ²)	141.36±1.48 ^a	172.27±1.59 ^b	225.85±2.55 ^c
Total dorsal length(cm)	38.68±0.22 ^a	41.38±0.21 ^b	46.30±0.21 ^c
Max dorsal width (cm)	5.93±0.04 ^a	6.78±0.04 ^b	7.83±0.06 ^c

Value within each row not sharing the same letter are significantly different (P<0.05).



TABLE V.3. HERITABILITIES (IN THE DIAGONAL, WITH \pm STANDARD ERROR) PHENOTYPIC CORRELATIONS (ABOVE THE DIAGONAL) AND GENETIC CORRELATIONS (IN ITALICS BELOW THE DIAGONAL, WITH \pm STANDARD ERROR) BETWEEN GROWTH AND IMAGE ANALYZED TRAITS FOR MEAGRE.



GROWTH TRAITS HERITABILITIES



At harvest weight, high positive phenotypic and genetic correlations between weight and length were observed (Table V.3). These two main growth traits showed a low phenotypic correlation and a moderate positive one with the condition factor.

Phenotypic and genetic correlation for growth traits with fillet and gutted weight were positive and elevated (higher than 0.88 in all cases). With respect to dressing percentage versus growth traits, moderate negative phenotypic correlation (lower than -0.17) and high positive genetic correlation were observed. Fillet percentage was difficult to get convergence and the estimates presented high errors, while it showed, in general, negative genetic correlations versus growth and carcass traits, and low-moderate positive phenotypic correlation with these traits.

Image data showed high positive phenotypic and genetic correlations among all morphological traits (Table V.3). High positive phenotypic and genetic correlations were observed between weight, length, gutted weight and fillet weight versus all image traits, except for fin width where phenotypic correlations were low. Condition factor, showed a low phenotypic correlation with all morphologic traits. Thus, a moderate high negative correlation was observed with condition factor and with dressing percentage. Dressing percentage showed a high negative genetic correlations with all morphologic traits.

V.4.3. Cardio-respiratory traits

The totality of fish shows a mean of 0.17 and 2.45% respectively for ventricle and gill body percentage, respectively. A statistically significant difference was found between heart and gill weight in fish facilities and it was similarly observed for the other growth traits. However, in percentage, there was no significant difference between facilities



respect to the ventricle; while, with respect to gill, it was observed a statistically significant difference between ICCM and CANEXMAR facilities ($P < 0.05$) (Table V.4).

Heritabilities were moderate to low in all traits (Table V.5). The higher was observed in the ventricular weight and the lower in the ventricular percentage. Phenotypic and genetic correlations ventricular and gill weights traits were moderate or very high (Table V.5), and high negative correlations among ventricle and gill weights traits versus ventricle percentage and gill percentage traits. High phenotypic and genetic correlations were observed between weight and length versus ventricle and gill weight. At the same time, a medium negative phenotypic correlation and high negative genetic correlation were observed between weight and length versus gill and ventricle percentage were observed.

TABLE V.4. CARDIO-RESPIRATORY TRAITS (MEAN \pm STANDARD DEVIATION) IN THE THREE FACILITIES FOR ON-GROWING MEAGRE.

Trait	ICCM	ADSA	CANEXMAR
Ventricular weight (g)	0.97 \pm 0.01 ^a	1.39 \pm 0.02 ^b	1.7 \pm 0.03 ^c
Ventricular rate (%)	0,17 \pm 0,00	0,17 \pm 0,00	0,16 \pm 0,00
Gill weight (g)	13.61 \pm 0.20 ^a	20.04 \pm 0.7 ^b	26.17 \pm 0.39 ^c
Gill rate (%)	2.38 \pm 0.020 ^a	2.49 \pm 0.02 ^{a,b}	2.5 \pm 0.05 ^b

Value within each row not sharing the same letter are significantly different ($P < 0.05$)



TABLE V.5. HERITABILITIES (IN THE DIAGONAL, WITH \pm STANDARD ERROR) PHENOTYPIC CORRELATIONS (ABOVE THE DIAGONAL) AND GENETIC CORRELATIONS (IN ITALICS BELOW THE DIAGONAL, WITH \pm STANDARD ERROR) BETWEEN GROWTH AND CARDIO-RESPIRATORY TRAITS FOR MEAGRE.

	Weight	Length	K	Ventricular weight	Gill weight	Ventricular %	Gill %
Weight	0.22\pm0.12	0.92	0.09	0.72	0.74	-0.34	-0.48
Length	<i>0.97\pm0.03</i>	0.19\pm0.11	-0.2	0.74	0.72	-0.32	-0.43
K	<i>0.35\pm0.44</i>	<i>0.34\pm0.46</i>	0.09\pm0.08	0.03	0.02	-0.02	-0.05
Ventricular weight	<i>0.98\pm0.17</i>	<i>0.99\pm0.02</i>	<i>0.24\pm0.41</i>	0.20\pm0.11	0.56	0.14	-0.34
Gill weight	<i>0.97\pm0.04</i>	<i>0.92\pm0.1</i>	<i>0.75\pm0.49</i>	<i>0.98\pm0.06</i>	0.08\pm0.05	-0.26	-0.21
Ventricular %	<i>-0.96\pm0.11</i>	<i>-0.94\pm0.17</i>	<i>-0.71\pm0.38</i>	<i>-0.95\pm0.14</i>	<i>-0.96\pm0.15</i>	0.02\pm0.04	0.39
Gill %	<i>-0.98\pm0.09</i>	<i>-0.96\pm0.07</i>	<i>0.32\pm0.49</i>	<i>-0.81\pm0.11</i>	<i>-0.95\pm0.15</i>	<i>0.92\pm0.25</i>	0.14\pm0.12



V.5. Discussion

V.5.2. Pedigree reconstruction

The inclusion of microsatellite multiplex PCRs in a breeding program is a good solution to reduce the time and cost which are associated with molecular analysis. In fact, multiplex PCRs reduce samples number to be manipulated and errors risks (Delghandi *et al.*, 2003; Porta *et al.*, 2006; Navarro *et al.*, 2008, Borrell *et al.*, 2011). The use of two multiplex PCRs meagre inter- and intra-specific permits to assign each offspring to a single parent pair in a 82.8% of cases. The number of families that is established in this study is within the range that others studies of fish selection breeding programs (Gjerde *et al.*, 2004; Kolstad *et al.*, 2006; Castro *et al.*, 2008; Navarro *et al.*, 2009a; Kause *et al.*, 2011). Furthermore, the contribution of a higher number of sires and dams provides a higher power and better quality results to our genetic variable evaluations.

V.5.3. Phenotypic growth parameters

Meagre reach a commercial weight of 800-1000 g at 430-500 DPH depending of breeding system and conditions (Muñoz *et al.*, 2008; Cárdenas, 2010). In this study, fish attained this weight range at 446 DPH, showing significant differences in all growth traits and image analyzed traits among the three facilities. Being observed, higher growth parameters in fish reared offshore, which can be explained by the installation nature of the facilities. In fact, Pastor *et al.* (2002) observed a higher growth rate for meagre reared in offshore installations respect to tank one.

Chatzifotis *et al.* (2010), in a nutritional study, detected a low growth for meagre in tanks. This discrepancy may be due to stress caused by the maladaptive process and to the dynamic nature of meagre (Jiménez *et al.*, 2005).



The mean of dressing rate described was similar to that observed by Grigorakis *et al.* (2011) and slightly lower than the described in meagre with the same weight profile (93.4% and 94.4%, respectively) (Poli *et al.*, 2003; Piccolo *et al.*, 2008).

Furthermore, fillet rate, without skin, was higher rate than the observed by Poli *et al.* (2003) (34.6 %) and lower than the reported by Piccolo *et al.* (2008) and Grigorakis *et al.* (2011) (50% and 42 %, respectively) in meagre fillet with skin. This difference can be attributed to fish morphology, the method and material used during the process, and the staff filleting experience. Rutten *et al.* (2005) affirmed that the filleting method was probably the most likely cause for the increased fillet yield.

When comparing dressing and fillet rates of this study with other aquaculture species such as sea bass (Poli *et al.*, 2001) (89.4 and 36.8%, respectively) and gilthead sea bream (Navarro *et al.*, 2009a) (92% and 35%, respectively) we suggest that meagre had a great potential to be commercialized as a fillet product due to its high fillet rate and volume at commercial weight respect to other species. These data corroborate the economic interests of both traits and the necessity of genetic estimations of fillet and gutted traits.

V.5.2. Heritabilities and correlations

In the present study, heritabilities for growth and carcass traits in meagre have been estimated. It is widely known that selective breeding exploits the substantial genetic variation available for the majority of desirable quality traits (Gjedrem and Baranski, 2008). This variation has been associated with economic traits like growth, flesh colour and disease resistance to improve the selection response in future generation. In this way, heritability estimation is necessary to know the selection response and can be used to establish and to improve meagre breeding programs.



The growth traits heritabilities detected, especially in body weight and gutted weight, were the higher as those estimated by other authors in aquaculture species (Gjerde *et al.*, 2004; Dupont-Nivet *et al.*, 2008; Vandeputte *et al.*, 2009; Navarro *et al.*, 2009a; Kause *et al.*, 2011). Body weight heritabilities in the present study are in the usual range described in other species such as common carp (*Cyprinus carpio*) or Atlantic salmon (*Salmo salar*) (0.21-0.44) (Gjedrem, 2000; Kocour *et al.*, 2007) and in sea bass (*Dicentrarchus labrax*) (0.24-0.44) (Saillant *et al.*, 2006; Dupont-Nivet *et al.*, 2008). The obtained heritability values were within the range of 0.2 and 0.3, suggesting the possibility of large response and a rapid gain, which could be achieved via direct selection (Gjedrem, 2000).

As expected, a high positive phenotypic and genetic correlation was observed between length and weight. These two traits are usually highly correlated (Dupont-Nivet *et al.*, 2008; Navarro *et al.*, 2009a; Saillant *et al.*, 2009; Vandeputte *et al.*, 2009; Kause *et al.*, 2011). Furthermore, heritability was quite similar sustaining the possibility to use one of the two traits in the selection breeding scheme. Providing that neither of them could negatively affect other carcasses nor quality trait, like in sea bass, where both traits genetic correlations with factor condition were different, and selection based in these traits is not equivalent (Dupont-Nivet *et al.*, 2008). At the present study, weight and length had a same moderate genetic correlation with the factor condition. However, phenotypic correlations were low and different. This can be explained by the specificity of the condition factors, which is representative of each species and can be varied within species, affected by fish morphology, maturity, age and environment (Navarro *et al.*, 2009a). In addition, heritability was low (0.09) and similar to that previously observed in other species, (0.1) by Saillant *et al.* (2009) in sea bass and 0.13 by Navarro *et al.* (2009a) in gilthead sea bream. In other studies, condition factors were higher and ranged from



0.34 to 0.36 in seabass (Dupont-Nivet *et al.*, 2008), from 0.47 to 0.65 in the rainbow trout (Kuukka-Anttila *et al.*, 2010) and 0.49 in the european whitefish (Kause *et al.*, 2011).

In this work, growth traits had a high phenotypic and genetic correlation estimates with fillet weight. This correlation is typically highly positive in fish and is beneficial because fillet weight is economically the most valuable part in processed fish (Kause *et al.*, 2007; Navarro *et al.*, 2009b; Nguyen *et al.*, 2010; Kause *et al.*, 2011). Also, the heritability of fillet weight are moderate in meagre, which, taken together with the high genetic correlation with body weight, increased the probability to indirectly selection this trait via recorded harvest weight. However, in appearance, fillet percentage has low and negative genetic correlations with harvest weight, in accordance with estimations in gilthead seabream (Navarro *et al.*, 2009a). This data suggests that fillet percentage improvement via growth selection may be difficult (Kause *et al.*, 2007; Nguyen *et al.*, 2010) and that it is less relevant (Rutten *et al.*, 2005), but its inclusion in breeding program is recommended (Navarro *et al.*, 2009a).

The higher genetic and phenotypic correlations estimates of image traits with growth traits and the similar heritabilities estimated between both, confirm that image technology analysis could be a fast and no-invasive solution to substitute the hard and expensive collection data. Moreover, image analysis could provide a very accurate description of the body at a reasonable cost, even before slaughter. Also, it is a first step to use the image like a supporting technique to develop a selection breeding program in meagre; as it has been proposed for some species (Osawa *et al.*, 2008, Rius-Vilarrasa *et al.*, 2009, 2010) and for quality traits in rainbow trout (Kause *et al.*, 2008). Furthermore, it is important to described, and validated, an image analysis method for recording traits, so that it can be used in the future like a substitute of standardly sampled traits. In meagre, total and fillet



areas seem to be the two traits with the highest and similar heritabilities with the different sampled weights, and could be the legitimate substitute of these traits. Total length may be the analyzed trait, and can substitute the length in the same sense. Additionally, genetic selection can be executed with more success on traits highly heritable, such as max.-width and dorsal area versus weight and length.

V.5.3. Cardio-respiratory heritabilities and correlations

Study analyzing the morphologic relation between heart and gill are scarce in *scianedae* fish (Fitzgibbon *et al.*, 2007), and no existent in meagre. However, there is an affirmation that both have a common interaction point; the use and distribution of the oxygen throughout the fish organs (Brodeur *et al.*, 2001). Growth, which is an energetically demanding process, depends on the availability of oxygen (Blier and Pelletier, 1997), so besides being related to the gill it also influences the cardiac activity (Millidine *et al.*, 2008). The high phenotypic and genetic correlation that has been observed between heart and gill weight, and between both respect to fish weight and length, corroborate this theory. Moreover, these correlations associate the compensatory variation on heart (Goolish and Adelman, 1987) and gill weight (Hughes, 1972; Fernandes *et al.*, 1994; Severi *et al.*, 1997; Mazon *et al.*, 1998) to the adaptation to a growth variation.

However, the negative correlation between the of the cardio-respiratory traits percentage with the harvest weight shows that this adaptation is limited and that body weight increase is higher than gill and ventricular weight increases. The moderate heritability observed for ventricular weight, and the high genetic correlation with growth traits shows that a ventricular weight can be selected by indirect selection, especially because cardio-respiratory traits need sacrificing the fish, when, in addition, gill weight



and ventricular and gill rates have low heritability, and, under these circumstances, are difficult to be selected by direct selection.

V.6. Conclusion

This study shows for the first time, the potential use of growth and carcass traits as tools for the improvement of meagre industrial production, once obtained some genetic parameter estimates tools in improvement for meagre knows the genetic parameter estimates (heritabilities and genetic and phenotypic correlations). Body weight as a parameter seems to be a direct way to improve productions and an indirect via to control other economic traits, such as fillet weight and gutted body weight. Furthermore, this work establishes a way to substitute the hard and expensive standard sampling fish method with image analysis process, the efficiency of which has been proved in the evaluation of the carcass traits.

V.7. Acknowledgement

Authors thank the help and the effort of all members of Grupo de Investigación en Acuicultura for help during sampling days especially for Silvia H, Guaci, Manola, Ada, Fefy, Ivon, Alex, Silvia T, Juan, Tibi, Monica, Fran, Fatima, Islam and Dailos. A special thank to ICCM, CANEXMAR and ADSA Company and Staff for their help during the on-growing period. This study has been supported by project of the Canary Government (PI 2007/052) and a doctoral grant from the Agencia Española de Cooperación Internacional (AECID).



GROWTH TRAITS HERITABILITIES

Estimates of genetic and phenotypic parameters for body composition and quality traits in meagre (*Argyrosomus regius*).

168102



VI. Estimates of genetic and phenotypic parameters for body composition and quality traits in meagre (*Argyrosomus regius*).

VI.1. Abstract

Heritabilities, phenotypic and genetic correlations for growth traits and flesh quality traits (ash, moisture, flesh fat percentage, visceral fat weigh and percentage, *Hue* and collagen) were estimated in meagre (*Argyrosomus regius*). This study is carried out using 1183 fish from an industrial stock reared in three different facilities and constituted by 59 families that were produced by mass mating (25 sires plus 22 dams). Parental assignment was provided using two multiplex PCRs to do a screening of 18 microsatellites (Soula *et al.*, 2011). The heritability estimates for quality traits were low or moderate and ranged from 0.00 to 0.27. Heritability estimates for ash (0.04 ± 0.06), moisture (0.08 ± 0.07), flesh fat percentage (0.02 ± 0.02), skin color (*Hue*) (0.05 ± 0.05) and collagen (0.00 ± 0.01) were low. Heritability estimates for visceral fat weight (0.27 ± 0.12) and visceral fat percentage (0.22 ± 0.09) were medium. The genetic correlation between body weight and moisture was moderate negative and ash was high positively correlated with meat color. Furthermore, there were high and positive genetic correlations between body weight versus visceral fat weight and flesh fat percentage.

Between quality traits, negative correlations were detected between visceral fat versus ash, moisture and collagen, such us flesh fat versus moisture and collagen. Also, high positive correlation of visceral fat weight and visceral percentage with gutted weight were observed. Meat color, evaluated like *Hue* parameter showed a moderate to high negative



genetic correlation with flesh fat percentage, visceral fat percentage and collagen. However these genetic correlations with moisture, dressing percentage and ash were positive.

These data suggest that particular attention should be given to indirect selection on flesh fat percentage, ash, moisture and *Hue* in meagre breeding programs, through growth traits, due to their low heritabilities and important genetic correlations with growth and carcass traits. Thus, direct selection for growth and visceral fat weight, which are easily measured and reported the higher heritabilities in this study, with gutted weight, improves indirectly flesh palatability through increase flesh fat percentage but decrease dressing percentage and has to be controlled.

Keywords: meagre, *Argyrosomus regius*, heritability, flesh quality and genetic correlation.



VI.2. Introduction

Meagre (*Argyrosomus regius*) is consolidated like a potential species in Mediterranean aquaculture, behind seabream (*Sparus aurata*) and seabass (*Dicentrarchus labrax*); due to its rapid growth and acceptability from the consumers, among other characteristics (Pastor *et al.*, 2002). Furthermore, the great area of improvement in the rearing techniques of meagre and the interest of many aquaculture farms to invest in this species have increased the production during the last ten years (FAO, 2010; APROMAR, 2011).

The aim of every commercial enterprise is the maximum economic, so they opt for a rapid growth at the lowest possible cost. This is one of the reasons by which the majority of selection breeding programs was based in the heritability estimation of growth traits (Navarro *et al.*, 2009a).

However, the changes in consumer profile and market demands forces a new targeting strategy focused on more qualitative aspects. Therefore, newer studies for genetic parameters estimation were focused on quality traits, such as fat composition (Quinton *et al.*, 2005; Kokour *et al.*, 2007; Vieira *et al.*, 2007; Navarro *et al.*, 2009b; Kause *et al.*, 2011), moisture percentage (Quinton *et al.*, 2005; Saillant *et al.*, 2009; Navarro *et al.*, 2009b) and ash and collagen percentage in gilthead seabream (Navarro *et al.*, 2009b). Additionally, genetic parameters of carotenoid pigment contents and colour traits (*Hue*, saturation and intensity) were estimated in Atlantic salmon (*Salmo salar*) by Powell *et al.* (2008) and Quinton *et al.* (2005), and in Coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*) by Iwamoto *et al.* (1990).



Nowadays, in meagre there are no publications about genetic parameters estimation for important production traits. Even, some studies in meagre have been interested in growth and quality traits (Poli *et al.*, 2003; Grigorakis *et al.*, 2011). In this sense, comparative studies were conducted with other cultured species such as seabream and seabass. They were based on quality traits like protein, fat and moisture percentage and concluded that meagre chair quality is more similar to catfish than other studied species (Poli *et al.*, 1999; 2001) and was classified as an intermediate position respect to body composition among the most important aquaculture species (Bykov, 2000).

The aim of the present study is to define, under industrial conditions, the most important genetic and phenotypic parameters of quality traits in relation to body composition and growth from a meagre broodstock.

VI.3. Materials and methods

VI.3.1. Breeding conditions

At Instituto Canario de Ciencias Marinas (ICCM, Gran Canaria, Spain), a meagre broodstock consisting of 140 adults was established in 2006. During April 2008, a total of 76 breeders were induced with $15 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ GnRH dose. After fertilization, eggs were incubated at the hatchery and larvae were reared at ICCM mesocosm facilities as described by Roo *et al.* (2010).

At 150 days, fingerlings were divided into 3 lots and distributed among three different sites: the offshore farm of the CANEXMAR S.L. Company (Las Huesas, Gran Canaria, Spain), the up-growing installations of ADSA S.L. Company, alternating rearing in onshore and offshore (Castillo del Romeral, Gran Canaria, Spain), and the facilities of ICCM. These fish were tagged with *Passive Integrated Transponder* (PIT, Trovan) and



reared until 446 days, their harvest age. Fish density ranged between 6 during initial on-growing period and $13 \text{ kg} \cdot \text{m}^{-3}$ at the end of this period. Food was provided three times per day manually and using commercial feed fish (Ecolife 62, Proaqua[®] S.A.).

VI.3.2. Body composition and quality traits

At harvest size (446 days post-hatch) on July 2009, fish from ICCM (475 fish), a sample of fish from CANEXMAR S.L. Company (310 fish) and fish from ADSA S.L. Company (400 fish) were slaughtered, and body weight and fork length were measured. Condition factor was calculated as follows: $100 \times \text{body weight} \times \text{fork length}^{-3}$.

Colour was determined behind the pectoral fin using a tristimulus colorimeter (Chroma Meter CR-200, Minolta, Osaka, Japan). The colour parameters recorded were L^* : lightness, which ranged from 0 for black to 100 for white, a^* : for red/green chromaticity and b^* : for yellow and blue chromaticity. According to International Commission on Illumination recommendations, CIE (1976). Hue (H_{ab}) values were calculated from a^* and b^* values, as follow: $H_{ab} = \arctang(b^*/a^*)$ (Hunt, 1977).

Visceral fat depots were manually removed, weighed and expressed as a percentage of the body weight. Then, gutted body weight was recorded and also expressed as a percentage of the body weight (dressing percentage). Fish were skinned and filleted, and fillets were vacuum-packed and frozen at -20°C prior to compositional analysis. Flesh composition was determined according to the standard method (AOAC, 1990): moisture by drying at 104°C for 24 h, ash by incineration at 550°C and fat by extraction with petroleum ether by the Soxhlet method using the Soxtec[®]1043 system HT (Foss Tecator, Sweden). All these traits were expressed as a percentage of fresh muscle weight, with the exception of fat percentage. Muscle collagen content was evaluated according to the



method described by Palka (1999), which is based on the determination of the hydroxyproline content in a muscle sample. To convert the quantity of hydroxyproline into collagen, a factor of 8 was used, and expressed as a percentage of fresh muscle. All of these previously described methods were performed in duplicate.

VI.3.3. Genotyping and paternity

All offspring and breeders were genetically characterised by using the two multiplexes STRi and STRs (Soula *et al.*, 2011). Familial assignments for meagre broodstock of unknown gender were determined using the exclusion method with a non-commercial software provided by Vandeputte *et al.* (2006).

VI.3.4.2.4. Data analysis

All data were tested for normality and homogeneity of variances. Then, they were analysed with SPSS (v19.0) (SPSS, Chicago, IL, USA) using a General Linear Model, in order to detect facility effect.

The repeatability of the fillet composition analysis was calculated using the following linear model:

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

where Y was the fish data, μ the population mean, F_i the replica fixed effect and ε_{ij} the residual error.

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

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



where y was the recorded data on the studied traits, β the facility fixed effect, u the random animal effect and e the error. The model was resolved with the software package VCE (v 6.0) (Kovač *et al.*, 2002). REML was used to estimate heritabilities as well as phenotypic and genetic correlations, along with their standard errors. The magnitude of estimated heritability was established, according the classification of Cardellino and Rovira (1987).

VI.4. Results

VI.4.1. Parental assignment

The application of the two multiplex PCRs in familial assignment obtained a 82.8% of success a single pair parents, appearing a 16.5% of offspring with more than a parent pair possibility and only a 0.7% without assignments. From the second group, 95 unique parents were recovered for the genetic estimation analysis in the VCE software package, and the final fish number used was 1070. Parentage showed the existence of 59 full sib families with a contribution of 22 dams and 25 sires for the totality of assigned fish.

Among the 1185 offspring, 975 were assigned to a single parent pair, and 102 were assigned to several parental pairs. From this group, 95 unique parents of which were recovered for the analysis, so 1070 fishes were used to get estimates in VCE program.

VI.4.2. Quality traits and phenotypic correlation

At harvest weight, statistically significant differences were detected when comparing the ICCM facility and the two companies with respect to weight, length, gutted weight and dressing percentage ($P < 0.05$). So, in quality traits too, a statistical difference in the



majority of traits was observed ($P < 0.05$) (visceral fat weight, visceral fat%, moisture%, ash%, flesh fat%, Hue, collagen%) (Table VI.1).

TABLE VI.1. PHENOTYPIC RESULTS OF GROWTH AND QUALITY TRAITS (\pm STANDARD ERROR) OF MEAGRE IN THE THREE DIFFERENT FACILITIES.

Traits	ICCM	ADSA	CANEXMAR
Body weight (g)	583.98 \pm 8.27a	817.33 \pm 10.42 ^b	1105.53 \pm 18.39 ^c
Body length (cm)	37.04 \pm 0.19 ^a	40.9 \pm 0.18 ^b	45.68 \pm 0.29 ^c
Condition factor (gcm-3)	1.11 \pm 0.00	1.17 \pm 0.00	1.16 \pm 0.04
Gutted weight (g)	519.9 \pm 7.34 ^a	729.38 \pm 9.48 ^b	970.78 \pm 14.39 ^c
Dressing (%)	89.05 \pm 0.08 ^{a,b}	89.41 \pm 0.26 ^b	88.38 \pm 0.37 ^a
Visceral fat weight	3.94 \pm 0.14 ^a	6.79 \pm 0.3 ^b	20.5 \pm 0.86 ^c
Visceral fat %	0.61 \pm 0.02 ^a	0.73 \pm 0.02 ^b	1.67 \pm 0.05 ^c
Moisture (%)	76.07 \pm 0.00 ^a	75.11 \pm 0.00 ^b	74.4 \pm 0.00 ^c
Ash (%)	1.37 \pm 0.00 ^c	1.32 \pm 0.00 ^a	1.33 \pm 0.00 ^b
Flesh Fat (%)	3.92 \pm 0.00 ^a	4.62 \pm 0.00 ^b	6.75 \pm 0.00 ^c
Hue	91.22 \pm 0.38 ^b	90.94 \pm 0.24 ^b	86.44 \pm 0.43 ^a
Collagen %	0.034 \pm 0.00 ^c	0.032 \pm 0.00 ^a	0.033 \pm 0.00 ^b

Value within each row not sharing the same letter are significantly different ($P < 0.05$).



TABLE VI.2. HERITABILITIES (IN THE DIAGONAL, WITH \pm STANDARD ERROR) PHENOTYPIC CORRELATIONS (ABOVE THE DIAGONAL) AND GENETIC CORRELATIONS (IN ITALICS BELOW THE DIAGONAL, WITH \pm STANDARD ERROR) BETWEEN GROWTH TRAITS AND QUALITY FOR MEAGRE.



QUALITY TRAITS HERITABILITIES



These differences in the three facilities showed that fish in the facility with higher body weights had lower moisture, a higher flesh and visceral fat percentage. Thus, rates for dressing percentage were so close and only a statistical difference between ADSA company and CANEXMAR company were detected. For ash and collagen, higher data was observed in ICCM facility and lower in CANEXMAR Company. Furthermore, the determination of *Hue* data proves that meagre skin showed statistical difference between CANEXMAR fish with a darker skin and the two other facilities with a yellow skin.

VI.4.2. Heritabilities and correlations

Phenotypic and genetic correlations among quality traits and their heritabilities, are shown in Table VI.2. Heritabilities were low to moderate for all traits and ranged from 0.00 to 0.27 for collagen and visceral fat weight, respectively. Phenotypic and genetic correlation in quality traits showed similar results; higher data values for genetic correlations, until 0.99 between flesh fat percentage and gutted weight.

Growth traits showed a moderate to high inverse genetic correlations with moisture, ash and *Hue* data (ranging from -0.55 to -0.88). Thus, high and positive genetic correlations were observed between growth traits versus visceral fat weight and fat percentage and flesh fat percentage. For quality traits, a negative tendency correlation was observed between two groups; visceral fat weight, visceral fat percentage and flesh fat versus ash, moisture and collagen. Furthermore, visceral fat weight and visceral fat percentage showed a high positive correlation with gutted weight, and high negative correlation with dressing percentage. Respect to colour parameter *Hue* data showed a moderate to high negative genetic correlation with fat percentage, visceral fat weight and visceral fat percentage and collagen, and high genetic correlation with moisture, dressing percentage and ash.



VI.5. Discussion

VI.5.1. Phenotypic quality traits

Economic traits can change from one to another species and from one to another country (Gjedrem, 1997). This versatility suggests that defining flesh quality traits before implementing selection breeding programs has gradually gained importance. This is specially interesting when the work is made with a new species on which few studies have been published (Poli *et al.*, 2003; Chatzifotis *et al.*, 2010; Roo *et al.*, 2010; Grigorakis *et al.*, 2011). Also, it points out that the production is expected to grow fast in the medium term, due to intrinsic values such as attractive fish shape, good processing yield, good nutritional values, low fat content, excellent taste, and firm texture (Monfort, 2010).

In this study, the different environments of rearing system can explain the statistical differences in phenotypic data between the three facilities for the majority of traits. This difference does not involve that these traits ranges were in concordance with the mentioned in different studies on quality and chemical composition of meagre (Bykov 2000; Poli *et al.*, 2003; Chatzifotis *et al.*, 2010; Grigorakis *et al.*, 2011).

Results obtained in this study showed higher moisture percentage and lower percentage of ash, visceral percentage, flesh fat percentage and collagen in muscle than those of seabass Poli *et al.* (2003). Grigorakis *et al.* (2011) confirmed that meagre reared in captivity develop lower amounts of muscular fat than commonly Mediterranean raised aquaculture species. This data is an important indicator of meagre flesh quality, especially for a consumer with more and more exigencies and healthy food demand.



Periago *et al.* (2005) showed that collagen and hydroxyproline contents had a positive correlation with muscle fibre density and a great contribution to a firmer texture. This conversion from collagen to texture could be affirmed by texture analysis in order to get a reliable data. So, the lower collagen percentage found in this species reflects that meagre texture was firmer than sea bass texture.

Another fish quality and acceptability parameter is the skin colour. Commonly, meagre has silver-grey body colour, with dorsal bronze traits and brown post-mortem colour (FAO, 2012). Data obtained for the skin colour varied between brown and yellow in the *Hue* spectre value (86-91). When comparing this results with L, a, b (0.516, -0.006, 0.057, respectively) reported by Hernandez *et al.* (2009), we observed that colour tendency is common but a little variation exists in colour intensity between the two experiments. This difference may be due to the environment (Fanouraki *et al.*, 2007), the reared facilities like observed between fish from CANEXMAR company and ICCM, and, mainly, to differences from the body location used for colour measure (Filadelfi and Castrucci, 1996).

VI.5.2. Heritabilities and correlations

In various species, great phenotypic and genetic correlation were observed between weight, length, fillet, gutted weight and dressing percentage (Kause *et al.*, 2007; Navarro *et al.*, 2009 a,b; Kause *et al.*, 2011). As well as in meagre (Soula *et al.*, 2011). This information might be the basis of growth traits selective breeding program. However, the growth trait selection may, also unintentionally, reduce quality if unfavourable genetic correlations between production and quality traits exist (Kause *et al.*, 2011).

Negative correlation between fat and moisture content is common for fish species (Jobling *et al.*, 1998; Quinton *et al.*, 2005; Memon *et al.*, 2011). In this sense, the results



observed in this study (a negative correlation between body weight and moisture, and a positive correlation between body weight and visceral fat weight and flesh fat, percentage) might suggest that liquid in fish with the highest body weight is compensated by fat accumulation in different locations. Same correlations were observed in other genetic estimations, such as in Atlantic salmon (Quinton *et al.*, 2005) in common carp (Kocour *et al.*, 2007) and in European whitefish (Kause *et al.*, 2011), and they were determinant to design a selection breeding scheme.

The low heritabilities of ash, fat percentage and moisture observed in this study are similar than the observed by Navarro *et al.* (2009b) (0.08 and 0.09, respectively), in gilthead seabream with similar culture conditions. This data were predictable, when considering the low rate of muscle fat in meagre and admitting that this species is classified as a low-fat fish (Chatzifotis *et al.*, 2010; Piccolo *et al.*, 2008; Hernández *et al.*, 2009). This different heritability for flesh fat percentage, with respect to other species such as Atlantic salmon (0.19-0.21) (Rye and Refstie 1995; Quinton *et al.*, 2005; Vieira *et al.*, 2007) and sea bass (0.28) (Saillant *et al.*, 2009) suggests that flesh fat percentage can not be used as a direct selection parameter in a breeding program. The same conclusion can be taken for ash and moisture. However, high correlations of these parameters with growth traits suggest a controlled indirect selection.

In contrast, the moderate heritability of visceral fat weight and visceral fat percentage, as well as their high correlations with body and gutted weight, impose the importance of these traits as selection breeding program goals. This data contrasted with the low genetic correlations observed by Gjerde and Schaeffer (1989), Navarro *et al.* (2009b), and Saillant *et al.* (2009) in other important aquaculture species. This issue is especially relevant and could avoid the negative effect that fat surrounding the visceral cavity has on



consumers (Grigorakis, 2007), at the same time that increases carcass yield. Since filleted meagre marketing is quite acceptable.

In addition, the high positive correlation of visceral fat weight and visceral fat percentage with gutted weight (besides the negative and high correlation with gutted percentage) suggests that a direct selection of visceral fat weight or percentage shall have an undesirable impact on dressing percentage. The same correlation tendency was reported by different authors (Gjerde and Schaeffer 1989; Kause *et al.*, 2002, 2007; Saillant *et al.*, 2009). It may bear in mind when a direct selection to decrease visceral fat and increase dressing percentage is a selection goal. In fact, excessive fat deposition in fish tissues may affect processing yield, product quality and storage stability of the final product and, consequently, its commercial value (Cowey, 1993; Ghanawi *et al.*, 2011). However, changing the great composition of internal organ may have detrimental effects of fish health and biological efficiency, as stored lipids are necessary for fish vital functions (Kause *et al.*, 2007).

The most important quality attribute of animal and fish products, from consumers' point of view, are sensory attributes, such as colour, texture, smell, and flavour (Boggio *et al.*, 1985). Skin colour may play an important role in the acceptability of fish by consumers. So, it must be analysed and included as an item in quality evaluation studies in cultured species. In this study, in spite of the low heritability and phenotypic correlation of *Hue* value with the majority of traits, moderate and high *Hue* value genetic correlations observations suggest that colour had a great genetic relation with important quality traits. The *Hue* value increases when weight, collagen, visceral fat percentage and flesh fat percentage decrease, and raises when moisture, ash and dressing percentage



increase. In salmonids, *Hue* value in fillet also showed a correlation with a biometrical traits and fat percentage (Gjerde and Schaeffer, 1989; Iwamoto *et al.*, 1990; Rye and Gjerde, 1996; Quinton *et al.*, 2005; Powell *et al.*, 2008). However, the comparison is quite difficult as analysis techniques and target tissues were different. It might indicate that the inclusion of this trait may help to maintain good acceptability levels of our aquaculture product.

The nature of fish muscle texture depends on a number of intrinsic biological factors that are related to muscle fibre density, and involving both fat and collagen content (Hernández *et al.*, 2009). In this study, collagen percentage showed null heritability, in concordance with (Navarro *et al.*, 2009b), which involves the impossibility of improvement of this trait via direct selection. However, low and moderate genetic correlations were detected with weight and fat percentage, respectively, and additional studies of this tendency are necessary to consider the improvement of collagen percentage via growth selection.

VI.6. Conclusion

This study provides genetic parameter estimates that are necessary to design a meagre selective breeding program which is focused on body composition and quality traits. Furthermore, the correlation of a growth trait with most of quality traits and the correlation of the last between them suggest a combination of growth and quality parameters as multiple breeding objective to reach an equilibrated product with high growth rate and good quality.



VI.7. Acknowledgement

Authors wish to thank assistance and the effort of all members of Grupo de Investigación en Acuicultura during sampling days, especially for Silvia H, Manola, Guaci, Ada, Fefy, Ivonne, Alex, Silvia T, Juan, Tibi, Monica, Fran, Fatima, Islam and Dailos. A special thank to ICCM, Canexmar and ADSA Company and Staff for assistance during on-growing period.

This study has been supported by project of the Canary Government (ACISII-PI 2007/052) and a doctoral grant from he Agencia Española de Cooperacion Internacional (AECID).



QUALITY TRAITS HERITABILITIES



CONCLUSIONES



VII. CONCLUSIONES

1. El marcaje físico con el *Passive Integrated Transponder* (PIT) en corvina posee su mejor localización y talla en la parte abdominal del pez desde los 4 gramos, talla en la cual no hay un efecto del marcaje sobre el crecimiento, la tasa de mortalidad ni tampoco la tasa de retención.
2. Desde los 3 gramos no hay un efecto del sistema de marcaje PIT sobre el bienestar de la corvina. Sin embargo, a tallas más pequeñas este bienestar puede ser desequilibrado y es reflejado en la modulación de la expresión del gen CYP1A.
3. El CYP1A es un marcador molecular que ha mostrado su eficacia a la hora de poner de manifiesto las variaciones que puede provocar una manipulación estresante por el pez. Este marcador puede ser utilizado perfectamente en la evaluación del bienestar en corvina.
4. Con el diseño de la PCR multiplex interspecifica se ha mostrado la eficacia de la amplificación cruzada de los microsatélites descritos en otros scianidos.
5. No existe diferencia importante entre las dos PCRs descritas en el presente trabajo (específica-interespecífica) respecto a la variabilidad genética del lote de reproductores del ICCM.
6. La caracterización genética de los grupos de corvina y el alto polimorfismo detectado en los lotes de IRTA y en los peces salvajes confirman la eficacia y la potencia de las dos PCR multiplex como herramientas de gran valor en estudios genéticos.
7. Los reproductores de corvina del ICCM mostraron una baja diversidad genética y un alta coascendencia entre ellos. Confirmando la procedencia del stock de un lote de cultivo originario de la misma puesta.



8. La eficacia de la STRs y STRi en conjunto (ha permitido una asignación del 82,8%) es probada incluso en la asignación entre grupos de hermanos carnales.
9. La amplificación de las dos PCR multiplex reflejó la importancia de los alelos nulos, lo que puede dificultar el proceso de la asignación de los descendientes sobre todo para los microsatélites interespecíficos.
10. Los caracteres de crecimiento de interés económico a varias edades en corvina han mostrado una determinación fenotípica ascendente con la edad y una determinación genética muy alta desde edades precoces, sugiriendo la posibilidad de realizar un programa de selección con objetivos de crecimiento desde tallas pequeñas.
11. Los datos de correlaciones genéticas y heredabilidades en corvina mostraron una alta determinación genética de los caracteres de crecimiento (peso y longitud), de los caracteres de canal (peso filete, peso eviscerado y porcentaje canal) y de la grasa evisceral, tanto el peso como el porcentaje.
12. Uno de los dos caracteres de crecimiento, el peso o la longitud, es suficiente para ser utilizado en el diseño de un esquema de selección genética dirigida al crecimiento, debido a que los dos muestran las similares correlaciones genéticas con todos los otros caracteres.
13. Los datos de correlaciones genéticas y heredabilidades reflejaron una baja determinación genética para todos los caracteres de calidad, excepto el color. No obstante, estos caracteres pueden ser trazados, de forma indirecta, en el programa de selección genética debido a las interacciones que tienen entre ellos, y con los caracteres de crecimiento y carcasa.
14. Las altas correlaciones observadas entre los caracteres muestreados y los datos recogidos de los análisis de imágenes sugieren que esta nueva técnica puede ser una nueva estrategia a la hora del diseño de programa de selección y puede substituir en algunos caracteres el muestreo tradicional de los peces. Así, el área



total, la longitud y el área filete total pueden substituir el peso, la longitud y peso filete respectivamente, en el diseño de un programa de selección genética usando las imágenes como técnica de análisis.

15. La alta correlación entre los diferentes órganos ligados al crecimiento, tal como el peso de ventrículo y de las branquias, que reflejan una adaptación morfológica, abre puertas en la integración de nuevos caracteres para los programas de selección.
16. La mejora en corvina basada en herramientas genéticas parece ser un hecho y una solución interesante para consolidar esta especie como un potencial para la acuicultura mediterránea, debido a los valores de parámetros genéticos indispensables en un programa de mejora genética que refleja este estudio, usando un lote de reproductores bastante consanguíneo.



CONCLUSIONES



BIBLIOGRAFÍA



VIII. Bibliografía

- Abreu, N., Socorro, J., Betancor, M., Caballero, M.J., Fernández-Palacios, H., Hernández-Cruz, C.M., Roo, J., Schuchardt, D. 2009. Nuevas aportaciones al estudio de la organogénesis en larvas de corvina (*Argyrosomus regius* Asso, 1801). Madrid, España. Pp 510–511
- Acolas, M.L., Roussel, J.M., Lebel, J.M. Baglinière, J.L. 2007. Laboratory experiment on survival, growth and tag retention following PIT injection into the body cavity of juvenile brown trout (*Salmo trutta*). Fisheries Research 86, 280–284.
- 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.
- Andersson, T. Förlin, L. 1992. Regulation of the cytochrome P450 enzyme system in fish. Aquatic Toxicology 24,1-20.
- Andrews, G. K. 2000. Regulation of metallothionein gene expression by oxidative stress and metal ions. Biochemistry Pharmacology 59, 95–104.
- AOAC, 1990. Official methods of analysis of the Association of Analytical Chemistry. Washington, DC .pp 134.
- APROMAR, 2009. La acuicultura marina de peces en España. España. Pp 47.
- APROMAR, 2011. La acuicultura marina de peces en España. Editorial especial 25 año. Cadiz. España. pp 35–36.



- Archangi, B., Chand, V., Mather P.B. 2009. Isolation and characterization of 15 polymorphic microsatellite DNA loci from *Argyrosomus japonicus* (mulloway), a new aquaculture species in Australia. *Molecular Ecology Resources* 9, 412–414.
- Astorga, N., Afonso, J.M., Zamorano, M., Montero, D., Oliva, V., Fernandez, H. 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.
- Aulstad, D., Gjedrem, T., Skjervold, H. 1972. Genetic and environmental sources of variation in length and weight of rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Journal of Fish Resarche Bd. Canada* 29, 237–241.
- Baras, E., Westerloppe, L., Melard, C., Philippart, J.C. 1999. Evaluation of implantation procedures for PIT-tagging juvenile Nile Tilapia. *North American Journal of Aquaculture* 61, 246–251.
- Baras, E., Malbrouck, C., Houbart, M., Kestemont, P., Mélard, C. 2000. The effect of PIT tags on growth and physiology of age-0 cultured Eurasian perch *Perca fluviatilis* of variable size. *Aquaculture* 185, 159–173.
- Barbato, F., Corbari, L. 1995. New species in Italy. Proceedings of the seminar of the CIHEAM Network on Socio-economic and Legal Aspects of Aquaculture in the Mediterranean (SELAM), Montpellier (France), 17-19 May 1995. Paris: CIHEAM / MEDRAP II / IFREMER, 1995. pp. 123–128.



-
- Barcellos, L.J.G., Woehl, V.M., Wassermann, G.F., Krieger, M.H., Quevedo, R.M., Lulhier, F. 2001. Plasma levels of cortisol and glucose in response to capture and tank transference in *Rhamdia quelen* (Quoy and Gaimard), a South American catfish. *Aquaculture Research* 32 (3), 123– 125.
- Barcellos, L.J.G., Kreutz, L.C., de Souza, S.M.G., Rodrigues, L.B., Fioreze, I., Quevedo, R.M., Cericato, L., Soso, A.B., Fagundes, M., Conrad, J., de Almeida Lacerda, L., Terra, S. 2004. Hematological changes in jundia' (*Rhamdia quelen* Quoy and Gaimard Pimelodidae) after acute and chronic stress caused by usual aquacultural management, with emphasis on immunosuppressive effects. *Aquaculture* 237, 229– 236.
- Barton, B.A., Iwama, G.K. 1991. Physiological changes in fish from stress in aquaculture with emphasis, on the response and effects of corticosteroids. *Annual Review of Fish Disease* 10, 3 –26.
- Barton, B. A., Rahn, A. B., Feist, G., Bollig, H., Schreck, C. B. 1998. Physiological stress responses of the freshwater chondrosteian paddlefish (*Polyodon spathula*) to acute physical disturbances. *Comparative Biochemistry and Physiology* 120, 355–363.
- Barton, B.A. 2000. Salmonid fishes differ in their cortisol and glucose responses to handling and transport stress. *North American Journal of Aquaculture* 62,12–18.
- Barton, B.A. 2002. Stress in fishes: a diversity of responses with particular referente to changes in circulating corticosteroids. *Integrative and Comparative Biology* 42, 517–525.



- Batargias, C., Dermitzakis, E., Magoulas, A., Zouros, E. 1999. Characterization of six polymorphic microsatellite markers in gilthead seabream, *Sparus aurata* (Linnaeus 1758). *Molecular Ecology* 8, 897–898.
- Bateman, D.S., Gresswell, R.E. 2006. Survival and Growth of Age-0 Steelhead after Surgical Implantation of 23-mm Passive Integrated Transponders. *North American Journal of Fishery* 26, 545–550.
- Bayunova, L., Barannikova, I., Semenkova, T. 2002. Sturgeon stress reactions in aquaculture. *Journal of Applied Ichthyology* 18, 397–404.
- Biswas, A.K., Seoka, M., Takii, K., Maita, M., Kumai, M. 2006. Stress response of red sea bream *Pagrus major* to acute handling and chronic photoperiod manipulation. *Aquaculture* 252, 566–572.
- Blier, P.U., Pelletier, D. 1997. Does aerobic capacity set a limit on fish growth rate? *Reviews in Fisheries Science* 5, 323–340.
- Boggio, S.M., Hardy, W.H., Babbitt, J.K., Brannon, E.L. 1985. The influence of dietary lipid source and alpha-tocopheryl acetate level on product quality of rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Aquaculture* 51, 13–24.
- Bolland, J.D., Cowx, I.G., Lucas, M.C. 2009. Evaluation of VIE and PIT tagging methods for juvenile cyprinid fishes. *Journal of Applied Ichthyology* 25, 381–386.
- Borrell, Y.J., Gallego, V., García-Fernández, C., Mazzeo, I., Pérez, L., Asturiano, J.F., Carleos, C.E., 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.



-
- Bravo, C.F., Curtis, L.R., Myer M.S., Meador, J.P., Johnson, L.L., Buzitis, J., Collier, T.K., Morrow, J.D., Laetz, C.A., Loge, F.J., Arkoosh, M.R. 2011. Biomarker responses and disease susceptibility in juvenile rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* fed a high molecular weight PAH mixture. *Environmental Toxicology and Chemistry* 30(3), 704–714.
- Brodeur, J.C., Dixon, D.G., McKinley, R.S. 2001. Assessment of cardiac output as a predictor of metabolic rate in rainbow trout. *Journal of Fish Biology* 58, 439–444.
- Brown, R.C., Woolliams J.A., McAndrew, B.J. 2005. Factors influencing effective population size in commercial populations of gilthead seabream, *Sparus aurata*. *Aquaculture* 247, 219–225.
- Bruyndoncx, L., Knaepkens, G., Meeus, W., Bervoets, L., Eens, M. 2002. The evaluation of passive integrated transponder PIT tags and visible implant elastomer VIE marks as new marking techniques for the bullhead. *Journal of Fish Biology* 60, 260–262.
- Bykov, V.P. 2000. Chemicals composition and processing properties of marine and ocean fishes. Handbook, M. Vniro, Moscow.
- Calderón, J.A., Esteban, J.C., Carrascosa, M.A., Ruiz, P.L., Valera, F. 1997. Estabulación y crecimiento en cautividad de un lote de reproductores de corvina (*Argyrosomus regius*). En *Actas del VI Congreso Nacional de Acuicultura*, Cartagena, De Costa, J., Abellan, E., Garcia Garcia, B., Ortega, A. y Zamora, S. (eds.), Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación, Madrid, 365–370.
- Cardellino, R., Rovira, J. 1987. Mejoramiento genético animal. Hemisferio Sur, Buenos Aires. 253 pp.



- Cárdenas, S. 2010. Crianza de la corvinas (*Argyrosomus regius*). Fundación Observatorio Español de Acuicultura. Consejo Superior de Investigaciones Científicas. Ministerio de Medioambiente y Medio Rural y Marino. pp 52.
- 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.
- Celander, M. C. 2011. Cocktail effects on biomarker responses in fish. *Aquatic Toxicology* 105 S, 72–77.
- Chang, Y. M., Ding, L., Wang, W.W, He, J.G, Liang, L.Q , Lei, Q.Q. 2008. Isolation and characterization of 11 microsatellite markers for the large yellow croaker, *Pseudosciaena crocea*. *Conservation Genetics* 10, 1405–1408.
- Chao, L.N. 1986. Sciaenidae. In: *Fishes of the eastern Atlantic and Mediterranean, Poissons de l'Atlantique du nord-est et de la Méditerranée* (Whitehead, P. J. P., Bauchot, M.-L., Hureau, J. C. And Tortonese, E., eds), Paris: Unesco. pp 865–874.
- Chatzifotis, S., Panagiotidou, M., Papaioannou, N., Pavlidis, M., Nengas, I., Mylonas, C.C. 2010. Effect of dietary lipid levels on growth, feed utilization, body composition and serum metabolites of meagre (*Argyrosomus regius*) juveniles. *Aquaculture* 307, 65–70.
- Chistiakov, D.A., Hellemans B., Haley, C.S., Law A.S., Tsigenopoulos, C.S., Kotulas, G., Bertotto, D., Libertini, A., Volckaert, F.A.M. 2005. A microsatellite linkage map of the European sea bass *Dicentrarchus labrax* L. *Genetics* 170, 1821–1826.



-
- CIE, 1976. Official Recommendations on Uniform Colour Space, Colour Difference Equations and Metric Colour Terms. Suppl. No. 2 to CIE Publication No.15, Colorimetry. Commission International de l'Eclairage, Paris.
- CIHEAM, 1999. Marine finfish species diversification: current situation and prospect in mediterranean aquaculture. Options méditerranéennes, Serie B, 24.
- Cowey, C.B. 1993. Some effects of nutrition on flesh quality of cultured fish. Fish nutrition in practice. Proceedings of the IV international symposium fish nutrition and feeding. In: Kaushik, S.J., Luquet, P. (Eds.), Les Colloques, 61. INRA editions, Paris, France, pp. 227–236.
- Cruz, W., Grau, A., Pastor, E., Crespo, S., Sala, R. 2007. Desarrollo ontogénico de la larva de corvina (*Argyrosomus regius*): estudio preliminar. XI Congreso Nacional de Acuicultura, Xunta de Galicia. Vigo, pp 24–28.
- Dakin, E.E., Avise, J.C. 2004. Microsatellite null alleles in parentage analysis. *Heredity* 93, 504–509.
- Dare, M.R. 2003. Mortality and Long-term Retention of Passive Integrated Transponder Tags by Spring Chinook Salmon. *North American Journal of Fisheries Management* 23, 1015–1019.
- 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. *Journal of Marine Biotechnology* 5, 141–148.



- Dieterman, D.J., Hoxmeier, H.R. 2009. Instream evaluation of passive integrated transponder retention in brook trout and brown trout: Effects of season, anatomical placement, and fish length. *North American Journal of Fisheries Management* 29, 109–115.
- Dufossé, M. 1874. Recherches sur les bruits et les sons expressifs que font Onuki et Somiya 18 entendre les poissons d'Europe. *Annales des Sciences naturelles. Ser. 5, Zoologie et paleontology* 20, 1–134.
- Duhamel de Monceau, H. L. 1777. *Traité général des pêches et Histoire des poissons qu'elles fournissent tant pour la subsistance des hommes que pour plusieurs autres usages qui ont rapport aux Arts et au Commerce.* Paris, 3 , pp 136–139.
- Duncan, N., Estevez, A., Padros, F., Aguilera, C., Montero, F.E., Norambuena, F., Carazo, I., Carbo, R., Mylonas, C.C. 2008. Acclimation to captivity and GnRHa-induced spawning of meagre (*Argyrosomus regius*). *Cybium* 32 ((2) Suppl), 332–333.
- Dupont-Nivet, M., Vandeputte, M., Vergnet, A., Merdy, O., Haffray, P., Chavanne, H., Chatain, B. 2008. Heritabilities and GxE interactions for growth in the european sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) using a marker-based pedigree. *Aquaculture* 275, 81–87.
- El-Shebly, A. A., El-Kady, M. A.H., Hussin, A. B., Hossain, M. Y. 2007. Preliminary Observations on the Pond Culture of Meagre, *Argyrosomus regius* (Asso, 1801) (Sciaenidae) in Egypt. *Journal of Fisheries and Aquaculture Science* 2(5), 345–352.



-
- Elvingson, P., Nilson, K. 1993. Genetic and environmental components of variation in body traits of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) in relation to age. *Aquaculture* 118, 191–204.
- Estévez, A., Trevino, L., Kotzamanis, Y., Karakostas, I., Tort, L. Gisbert, E. 2011. Effects of different levels of plant proteins on the ongrowing of meagre (*Argyrosomus regius*) juveniles at low temperatures. *Aquaculture Nutrition* 17, 572–582.
- Evangelos, S.L., Aggelousis, G., Alexakis, A. 1989. Metal and proximate composition of the edible portion of 11 freshwater fish species. *Journal of Food Composition Analyse* 2, 37–381.
- Falconer, D.S., Mackay, T.F.C. 1996. *Introduction to Quantitative Genetics*. 4th ed. Prentice Hall, Toronto, ON. Pp 464.
- Fanouraki, E., Divanach, P., Pavlidis, M. 2007. Baseline values for acute and chronic stress indicators in sexually immature red porgy (*Pagrus pagrus*). *Aquaculture*, 265, 294–304.
- FAO, 2010. *La situación mundial de pesca y de acuicultura*. Departamento de Pesca y Acuicultura de la fao organización de las naciones unidas para la agricultura y la alimentación. Roma. pp 29–42.
- FAO, 2012. http://www.fao.org/fishery/culturedspecies/Argyrosomus_regius/en.



- Farias, I.P., Muniz, L.B., Astolfi-Filhot, S., Sampaio, I. 2006. Isolation and characterization of DNA microsatellite primers for *Cynoscion acoupa*, the most exploited sciaenid fish along the coast of Brazil. *Molecular Ecology Notes* 6, 660–663.
- Fasano, P., Zilli, L., Vitella, S. 2006. Assessing genetic diversity of a *Argyrosomus regius* stock using amplified fragment length polymorphism analysis. En *Aquaculture Europe 2006*. European Aquaculture Society, Florencia, Italia. Pp 1037.
- Feldhaus, J.W., Heppell, S.A., Mesa, M.G. Li, H. 2008. Hepatic heat shock protein 70 and plasma Cortisol levels in rainbow trout after tagging with a Passive Integrated Transponder. *Transactions of the American Fisheries Society* 137, 690–695.
- Fernandes, M.N, Rantin F.T., Kalinin, A.L., Moron, S.E. 1994. Comparative-study of gill dimensions of 3 erythrinid species in relation to their respiratory-function. *Canadian Journal of Zoology*. 72, 160–165.
- Fernández-Palacios, H., Hernández-Cruz, C.M., Schuchardt, D., Izquierdo, M.S., Roo, J. 2009a. Effect of co-feeding regimes on biological performance and biochemical composition of meagre (*Argyrosomus regius* Asso, 1801) larve. Páginas 108-111 en Hendry, C.I., Van Stappen, G., Wille, M., Sorgeloo, S., eds. *Larvi'09 – Fish & Shelfish Larviculture Symposium*. EAS Special Publication N° 38. Oostende, Bélgica.
- Fernández-Palacios, H., Schuchardt, D., Roo, J., Hernández-Cruz, C.M., Duncan, N., 2009b. Efecto de distintas dosis de GnRH α sobre la calidad de la puesta de corvina (*Argyrosomus regius*). XII Congreso Nacional de Acuicultura: Con la acuicultura alimentamos tu salud. Madrid, España. Pp 554–555.



-
- Fernández, J., González-Martínez, S. C. 2010. Sofsog: a suite of programs to avoid inbreeding in plantation designs. *Molecular Ecology Resources* 10, 393–396.
- Filadelfi, A.M.C., Castrucci, A.M.L. 1996. Comparative aspects of the pineal/melatonin system of poikilothermic vertebrates. *Journal of Pineal Research* 20, 175–186.
- Fishback, A.G., Danzmann, R.G., Sakamoto, T., Ferguson, M.M. 1999. Optimization of semi-automated microsatellite multiplex PCR systems for rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture*, 172, 247–254.
- Fitzgibbon, Q.P, Strawbridge, A., Seymour, R.S. 2007. Metabolicscope, swimming performance and the effects of hypoxia in the mullo way, *Argyrosomus japonicus* (Pisces: Sciaenidae). *Aquaculture* 270, 358–368.
- Fjalestad, K.T., Moen, T., Gomez-Raya, L. 2003. Prospects for genetic technology in salmon breeding programmes. *Aquaculture Research* 34, 397–406.
- Fotadar, R., Philips, B. 2011. Recent advances and new species in aquaculture. Willey Blackwell edition, pp 1–4.
- Fuentes, V., Zuasti E., Catanese, G., Infante C. Manchado, M. 2004. Isolation and characterization of ten microsatellite loci for Senagal sole (*Solea senagalensis* Kaup). *Molecular Ecology Notes* 4, 339–341.
- Fujii-Kuriyama, Y. Kawajiri, K. 2010. Molecular mechanisms of the physiological functions of the aryl hydrocarbon (dioxin) receptor, a multifunctional regulator that senses and responds to environmental stimuli. *Proceedings of the Japan Academy - Series B: Physical & Biological Sciences* 86, 40–53.



- Gamsliz, K., Neke, M. 2008. Embryonic development stages of meagre *Argyrosomus regius* 1801 under rearing conditions. 8th Larval Biology Symposium. Lisboa, Portugal.
- Ghanawi, J.G, Roy, L., Davis, D. A., Saoud I.P. 2011. Effects of dietary lipid levels on growth performance of marbled spinefoot rabbitfish *Siganus rivulatus*. *Aquaculture* 310, 395–400.
- Gheyes, A., Woolliams, J.A., Taggart, J.B., Sattarc, M.A., Dasc, T.K., Mc Andrewa, B.J., Penman, D.J. 2009. Heritability estimation of silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*) harvest traits using microsatellite based parentage assignment. *Aquaculture* 294 (1–4), 187–193.
- Gjedrem, T. 1997. Selective breeding to improve aquaculture production. *World Aquaculture* 28, 33–45.
- Gjedrem, T. 2000. Genetic improvement of cold-water fish species. *Aquaculture Research*. 31, 25–33.
- Gjedrem, T. 2005. Selection and breeding programs in aquaculture. Edition, Springer, pp 3-10.
- Gjedrem, T., Baranski, M. 2008. Reviews: Methods and Technologies in fish biology and fisheries, Selective Breeding in Aquaculture: An Introduction. Edition Springer. pp 25.
- 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.



-
- Gjerde, B., Røer, J.E., Lein, I., Stoss, J., Refstie, T. 1997. Heritability for body weight in farmed turbot. *Aquaculture International* 5, 175–178.
- Gjerde, B., Terjesen, B. F., Barr, Y., Lein, I., Thorland, I. 2004. Genetic variation for juvenile growth and survival in Atlantic cod (*Gadus morhua*). *Aquaculture* 236, 167–177.
- Goede, R.W., B.A. Barton. 1990. Organismic indices and an autopsy-based assessment as indicators of health and condition of fish. *American of Fishery Society Symposium* 8, 93–108.
- Goksøyr, A., Förlin, L. 1992. The cytochrome P-450 system in fish, aquatic toxicology and environmental monitoring. *Aquatic Toxicology* 22, 287–312.
- Goolish, E.M., Adelman, F.R. 1987. Tissue-specific Cytochrome Oxidase activity in largemouth Bass: the metabolic costs of feeding and growth. *Physiology Zoology* 60, 454–464.
- Gornati, R., Papis, E., Rimoldi, S., Terova, G., Saroglia M., Bernardini, G. 2004. Rearing density influences the expression of stress-related genes in sea bass (*Dicentrarchus labrax*, L.). *Gene* 341, 111–118.
- Grau, A., Rodríguez-rúa, A., Massuti-Pascual, E., Jiménez, M.T., Durán, J., Jiménez-Cantizano, R.M., Pastor, E., Cárdenas, S. 2007. Spawning of meagre *Argyrosomus regius* (Asso, 1801) using GnRH α . *Aquaculture Europe 2007*. European Aquaculture Society. Estambul, Turquía.



- Gries, G., Letcher, B.H. 2002. Tag retention and survival of age-0 Atlantic salmon following surgical implantation with passive integrated transponder tags. *North American Journal of Fisheries Management* 22, 219–222.
- 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., Fountoulaki, E., Vasilaki, A., Mittakos, I., Nathanailides, C. 2011. Lipid quality and filleting yield of reared meagre (*Argyrosomus regius*). *International Journal of Food Science Technology* 46, 711–716.
- Herbinger, C.M., O'Reilly, P.T., Doyle, R.W., Wright, J.M., O'Flynn, F. 1999. Early growth performance of Atlantic salmon full-sib families reared in single family tanks versus in mixed family tanks. *Aquaculture* 173, 105–116.
- Hernández-Cruz, C.M., Schuchardt, D., Roo, J., Borrero, C., Fernández-Palacios, H., 2007. Optimización del protocolo de destete de corvina (*Argyrosomus regius*, Asso, 1801). Libro de Actas del XI Congreso Nacional de Acuicultura. Xunta de Galicia, Vigo, España.
- Hernandez, M.D., Lopez, M.B., Alvarez, A., Ferrandini, E., Garcia, Garcia B., Garrido, M.D. 2009. Sensory, physical, chemical and microbiological changes in aquacultured meagre (*Argyrosomus regius*) fillets during ice storage. *Food Chemistry* 114, 237–245.



-
- Hopko, M., Zakêoe, Z., Kowalska, A., Partyka, K. 2010. Impact of intraperitoneal and intramuscular PIT tags on survival, growth, and tag retention in juvenile pikeperch, *Sander lucioperca* (L.). *Archives of Polish Fisheries* 18, 85–92.
- Hughes, G.M. 1972. Morphometrics of fish gills. *Respiration Physiology* 14, 1–25.
- Hunt, R.W.G. 1977. The specification of colour appearance: I. Concepts and terms, *Color Resarch Application* 2, 55–68.
- Iwama, G. K., Thomas, P. T., Forsyth, R. B., Vijayan, M. M. 1998. Heat shock protein expression in fish. *Reviews in Fish Biology and Fisheries* 8, 35–56.
- Iwamoto, R., Myers, J., Hershberger, W. 1990. Heritability and genetic correlations for flesh colouration in pen-reared Coho salmon. *Aquaculture* 86, 181–190.
- Jackson, T.R., Martin-Robichaud, D.J., Reith, M. 2003. Application of DNA markers to the management of Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*) broodstock. *Aquaculture* 220, 245–259.
- Jamieson, A., Taylor, S.C.S. 1997. Comparisons of three probability formulae for parentage exclusion. *Animal Genetic* 28, 397–400.
- Jarne, P., Lagoda, P.J.L., 1996. Microsatellites, from molecules to populations and back. *Trends Ecol. Evol.* 11, 424–429.
- Jennings M.J., Hatzenbeler GR, Kampa J.M. 2009. One-year retention of passive integrated transponders in adult muskellunge, and applications to broodstock management. *North Ameerican Journal Aquatic* 71, 330–332.



- Jiménez , M. T., Pastor, E., Grau A., Alconchel J. I., Sánchez R. Cárdenas S. 2005. Revisión del cultivo de esciénidos en el mundo, con especial atención a la corvina *Argyrosomus regius* (Asso, 1801). Boletín Instituto Español de Oceanografía 21 (1-4), 169–175.
- Jobling, M., Tveiten, H., Hatlen, B. 1998. Cultivation of Arctic charr: an update. *Aquaculture International* 6, 181–196.
- Johnson, N., Rexroad, III C.E., Hallerman, E.M., Vallejo, R.L., Palti, Y. 2007. Development and evaluation of a new microsatellite multiplex system for parental allocation and management of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) broodstock. *Aquaculture* 266, 53–62.
- Jönsson, M. E, Kai Gao, Olsson, J. A., Goldstone, J. V., Brandta, I. 2010. Induction patterns of new CYP1 genes in environmentally exposed rainbow trout. *Aquatic Toxicology* 98, 311–321.
- Jørgensen, H., Celander, M., Goksøyr, A., Iwata, M. 2001. The effect of stress on toxicant-dependent cytochrome p450 enzyme responses in the arctic charr (*Salvelinus alpinus*). *Environmental Toxicology and Chemistry* 20 (11), 2523–2529.
- 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.



-
- Karlsson, S., Renshaw, M.A., Rexroad, C.E., Gold, J.R. 2008. Permanent Genetic Resources: PCR primers for 100 microsatellites in red drum (*Sciaenops ocellatus*). *Molecular Ecology Resource* 8, 393–398.
- Kause A., Ritola O., Paananen T., Mäntysaari E., Eskelinen U. 2002. Coupling body weight and its composition: a quantitative genetic analysis in rainbow trout. *Aquaculture* 211, 65–79.
- Kause, A., Paananen, T., Ritola, O., Koskinen, H. 2007. Direct and indirect selection of visceral lipid weight, fillet weight, and fillet percentage in a rainbow trout breeding program. *Journal of Animal Science* 85, 3218–3227.
- Kause, A., Stien, L.H., Rungruangsak-Torrissen, 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.
- Kause, A., Quinton, C., Airaksinen, S., Ruohonen, K., Koskela, J. 2011. Quality and production trait genetics of farmed European white fish, *Coregonus lavaretus*. *Journal of Animal Science* 89, 959–971.
- Kentouri M., Papandroulakis N., Divanach P., 1995. Aquabank. A data base for Greek aquaculture. *Aquaculture Production Economics. Proceedings of the seminar of the CIHEAM Network on Socio-economic and Legal Aspects of Aquaculture in the Mediterranean (SELAM), Montpellier (France), 17-19 May 1995. Paris: CIHEAM / MEDRAP II / IFREMER, 1995. Cahier Options Mediterranean* 14, 257–263.



- Kirpichnikov, V.S. 1972. Methods and effectiveness of breeding the Ropshian carp. Communication I. Purpose of breeding, initial forms, and system of crosses. *Genetika* 8, 996–1001.
- Knaepkens, G., Maerten, E., Tudorache, C., De Boeck, G., Eens, M. 2007. Evaluation of passive integrated transponder tags for marking the bullhead (*Cottus gobio*), a small benthic freshwater fish: effects on survival, growth and swimming capacity. *Ecology of Freshwater Fish* 16, 404–409.
- Knibb, W., Gorshkova, G., Gorshkov, S. 1997. Selection for growth in the gilthead seabream, *Sparus aurata* L. *Israel Journal of Aquaculture -Bamidgeh* 49, 57–66.
- Kocour, M., Mauger, S., Rodina, M., Gela, D., Linhart, O., Flajshans, M., Vandeputte, M. 2007. Heritability estimates for growth and dress out traits in common carp (*Cyprinus carpio* L.) using a molecular pedigree. *Aquaculture* 270, 43–50.
- Kolstad, K., Thorland, I., Refstie, T., Gjerde, B. 2006. Genetic variation and genotype by location interaction in body weight, spinal deformity and sexual maturity in Atlantic cod (*Gadus morhua*) reared at different locations off Norway. *Aquaculture* 259, 66–73.
- Kovač, M., Groeneveld, E., García-Cortés, L.A. 2002. VCE-5: a package for the optimization of dispersion parameters. Proceedings of the 7th World Congress on Genetics Applied to Livestock Production, 20–23 August 2002, Montpellier, France.



-
- Kožul, V., Skaramuca, K., Kraljevic, M., Dulcic, J., Glamuzina, B. 2001. Age, growth and mortality of the Mediterranean amberjack *Seriola du-merili* (Risso 1810) from the south-eastern Adriatic Sea. *Journal of Applied Ichthyology* 17, 134–141.
- Kuukka-Anttila, H., Peuhkuri, N., Kolari, I., Paananen, T., Kause, A. 2010. Quantitative genetic architecture of parasite-induced cataract in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *Heredity* 104, 20–27.
- Lagardère, J.P, Mariani, A. 2006. Spawning sounds in meagre *Argyrosomus regius* recorded in the Gironde estuary, France. *Journal of Fish Biology* 69, 1697–1708.
- Lanari D., Poli B.M., Ballestrazzi R., Lupi P., D'Agaro E., Mecatti M. 1999. The effects of dietary fat and NFE levels on growing European sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.). Growth rate, body and fillet composition, carcass traits and nutrient retention efficiency. *Aquaculture* 179, 351–364.
- Lankford, S.E., Adams, J T.E., Cech, J. 2003. Time of day and water temperature modify the physiological stress response of the green sturgeon, *Acipenser medirostris* *Comparative Biochemistry and Physiology* 135^a, 291–302.
- Lankford, S.E., Adams, T.E., Miller, R.A. Cech, J.J.Jr. 2005. The cost of chronic stress: impacts of a non-habituating stress response on metabolic variables and swimming performance in sturgeon. *Physiological and Biochemical Zoology* 78, 599–609.
- Launey, S., Krieg F., Haffray, P., Bruant, J.S., Vannier, A., Guyomard, R. 2003. Twelve new microsatellite markers for gilted seabream (*Sparus aurata* L.): characterization, polymorphism and linkage. *Mol. Ecol. Notes* 3, 457–459.



- Lavié, A., Rodriguez-Rúa, A., Ruiz-Jarabo, I., Vargas-Chacoff, I., Cárdenas, S., Mancera, J.M. 2008. Physiological responses of juvenile of meagre, *Argyrosomus regius* (Asso, 1801), to density and temperature. EAS Special Publication 37, 369–370.
- Lee, J., Park, I.S., Cho, S.H. 2009. Long-term Effects of Passive Integrated Transponder Tagging on the Growth of Olive Flounder, *Paralichthys olivaceus*. Journal of World Aquaculture Society 40, 134–139.
- Lensi, P. 1995. La politique de diversification de l'aquaculture en Corse. La démarche "nouvelles espèces". Cahier Options Méditerranéenne 14, 137–148.
- Lerceteau-Köhler, E., Weiss, S. 2006. Development of a multiplex PCR microsatellite assay in brown trout *Salmo trutta*, and its potential application for the genus. Aquaculture 258, 641–645.
- Liu, Z.J., Cordes, J.F. 2004. DNA marker technologies and their applications in aquaculture genetics. Aquaculture 238, 1–37.
- Livak, K.J., Schmittgen, T.D. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C(T)}$ method. Methods 25, 402–408.
- Mahapatra, K.D., Gjerde, B., Reddy, P.V.G., Sahoo, M., Jana, R.K., Saha, J.N., Rye, M. 2001. Tagging: on the use of passive integrated transponder PIT tags for the identification of fish. Aquaculture Research 32, 47–50.
- Martínez-Llorens, S., Espert, J., Moya, J., Cerdá, M.J., Tomás-Vidal, A. 2011. Growth and nutrient efficiency of meagre (*Argyrosomus regius*, Asso1801) fed extruded diets with different protein and lipid levels. International Journal of Fisheries and Aquaculture 10, 195–203.



-
- Martínez-Rodríguez, G., Álvarez M.C., McAndrew, B.J. 1998. Genetic variability of European sea bass, *Dicentrarchus labrax* L: Data from a hatchery stock. *Aquaculture Research* 29, 851–853.
- Mateos Velasco, A. 2007. Una nueva especie para la acuicultura marina, la corvina, (*Argyrosomus regius*). XI Congreso Nacional de Acuicultura, Sesión Temática Diversificación. pp 519–52.
- Mazon, A.F., Fernandes, M.N., Nolasco, M.A., Severi, W. 1998. Functional morphology of gills and respiratory area of two active rheophilic fish species, *Plagioscion quamosissimus* and *Prochilodus crofa*. *Journal of Fish Biology* 52, 50–61.
- McDonald, G.J., Danzmann, R.G., Ferguson, M.M. 2004. Relatedness determination in the absence of pedigree information in three cultured strains of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture* 233, 65–78.
- Memon, N.N., Talpur F.N., Bhangar, M.I., Balouch, A. 2011. Changes in fatty acid composition in muscle of three farmed carp fish species (*Labeo rohita*, *Cirrhinus mrigala*, *Catla catla*) raised under the same conditions. *Food Chemistry* 126, 405–410.
- Millidine, K.J., Metcalfe, N.B., Armstrong, J.D. 2008. The use of ventilation frequency as an accurate indicator of metabolic rate in juvenile Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Canadian Journal of Fish. Aquatic. Science* 65, 2081–2087.
- Monfort, M.C. 2010. Present market situation and prospects of meagre (*Argyrosomus regius*), as an emerging species in Mediterranean aquaculture. *Studies and Reviews. General Fisheries Commission for the Mediterranean*. 89, 28–31.



- Morel, Y. Barouki, R. 1999. Repression of gene expression by oxidative stress. *Biochemistry Journal*. 342, 481–496.
- Mueller, S., Mayr, P., Bruns, U., Mueller, M. 2006. Direct Submission. mitochondrion meagre *Argyrosomus regius*, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/DQ916162>.
- Muñoz, J.L., Rodríguez-Rúa, A., Bustillos, P., Cárdenas, S. 2008. Crecimiento de corvina *Argyrosomus regius* (Asso, 1801) en estanques de tierra a distintas salinidades. *IV Jornadas de Acuicultura en el Litoral Sur atlántico. Nuevos retos*. Cartaya, Huelva.
- Navarro, A., Oliva, V., Zamorano, M.J., Ginés, R., Izquierdo, M., Astorga, N., Afonso, J.M. 2006. Evaluation of PIT system as method to tag fingerling of gilthead seabream (*Sparus auratus* L.): effects on growth, mortality and tag loss. *Aquaculture* 257, 309–315.
- 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., Zamorano, M.J., Hildebrandt, S., Ginés, R., Aguilera, C., Afonso, J.M. 2009a. Estimates of heritabilities and genetic correlations for body composition traits and G × E interactions, in gilthead seabream (*Sparus auratus* L.) *Aquaculture* 295, 183–187.



-
- Navarro, A., Zamorano, M.J., Hildebrandt, S., Ginés, R., Aguilera, C., Afonso, J.M. 2009b. Estimates of heritabilities and genetic correlations for growth and carcass traits in gilthead seabream (*Sparus auratus* L.), under industrial conditions. *Aquaculture* 289, 225–230.
- Neff, B.D., Fu, P., Gross, M.R. 2000. Microsatellite multiplexing in fish. *Transactions of the American Fisheries Society* 129, 584–593.
- Neira, R., Lhorente, J. P., Araneda, C., Diaz, 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.
- Nguyen, N.H., Ponzoni, R.W., Abu-Bakar, K.R., Hamzah, A., Khaw H.L., Yee, H.Y. 2010. 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.
- Nielsen, L.A., 1992. *Methods of marking fish and shellfish*. Bethesda, Md: American Fisheries Society Special Publication No. 23.
- Ning, Y., Liu, X., Wang, Z., Guo, W., Li, Y., Xie, F. 2007. A genetic map of large yellow croaker *Pseudosciaena crocea*. *Aquaculture* 264, 16–26.
- Nunnallee, E. P., Prentice, E. F., Jonasson, B. F. and Patten, W. 1998. Evaluation of a flat-plate PIT tag interrogation system at Bonneville Dam. *Aquaculture Engineering* 17, 261–272.
- O’Flynn, F.M., Bailey, J.K., Friars, G.W. 1999. Responses to two generations of index selection in Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Aquaculture* 173, 143–147.



- Olsen, J.B., Wenburg, J.K., Bentzen, P. 1996. Semiautomated multilocus genotyping of Pacific salmon (*Oncorhynchus spp.*) using microsatellites. *Molecular Marine Biology and Biotechnology* 5, 259–272.
- Olsvik, P.A., Kristensen, T., Waagbo, R., Tollefsen, K.E., Rosseland, B.O., Toften, H. 2006. Effects of hypo- and hyperoxia on transcription levels of five stress genes and the glutathione system in liver of Atlantic cod *Gadus morhua*. *The Journal of Experimental Biology* 209, 2893–2901.
- O'Malley, K.G., Colette, A.A., Kirstin, R., Gold, J. R. 2003. Microsatellite DNA markers for kinship analysis and genetic mapping in red drum, *Sciaenops ocellatus* (Sciaenidae, Teleostei). *Molecular Ecology Notes* 3, 155–158.
- Ombredane, D., Baglinière, J. L., Marchand, F. 1998. The effects of Passive Integrated Transponder tags on survival and growth of juvenile brown trout (*Salmo trutta* L.) and their use for studying movement in a small river. *Hydrobiologia* 371/372, 99–106.
- O'Reilly, P.T., Hamilton, L.C., McConnell, S.K., Wright, J.M. 1996. Rapid analysis of genetic variation in Atlantic salmon (*Salmo salar*) by PCR multiplexing of dinucleotide and tetra- nucleotide microsatellites *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 53, 2292–2298.
- Ortiz de Montellano, P.R. 2005. *Cytochrome P450: Structure, Mechanism, and Biochemistry*. 3rd edition, Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York. Pp 54.



-
- 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 stress. *Journal of Animal Science* 86, 40–46.
- Palka, K. 1999. Changes in intramuscular connective tissue and collagen solubility of bovine *m. semitendinosus* during retorting. *Meat Science* 53, 189–194.
- Park, M. O., Park, I.S. 2009. Long-term effects of passive integrated transponder (PIT) tagging on the kelp grouper *Epinephelus bruneus*. *Journal of Fish Biology*. 74, 285–288.
- Pastor, E., Grau, A., Massutí, E., Sánchez-Madrid, A. 2002. Preliminary results on growth of meagre, *Argyrosomus regius* (Asso, 1801) in sea cages and Indro tanks. *EAS Especial Publication* 32, 422–423.
- Pérez-Enríquez, R., Takaji, M., Taniguchi, N. 1999. Genetic variability and pedigree tracing of a hatchery-reared stock of red sea bream (*Pagrus major*) used for stock enhancement, based on microsatellite DNA markers. *Aquaculture* 173, 413–423.
- Periago, M.J., Ayala, M.D., López-Albors, O., Abdel, I., Martínez, C., García-Alcázar, A., Ros, G., Gil, F. 2005. Muscle cellularity and flesh quality of wild and farmed sea bass *Dicentrarchus labrax* L. *Aquaculture* 249, 175–188.
- Piccolo, G., Bovera, F., De Riu, N., Marono, S., Salati, F., Cappuccinelli, R., Moniello, G. 2008. Effect of two different proteína/fat ratios on the diet on meagre (*Argyrosomus regius*) traits. *Italian Journal of Animal Science*. 7, 363–371.
- Pires, D., Ribeiro, F., Magalhaes, M. F. 2010. Evaluation of PIT-tagging in an endangered Iberian cyprinid. *J. Appl. Ichthyol.* 26, 612–613.



- Poli, B.M., Parisi G., Lupi P., Mecatti M., Bonelli A., Zampacavallo G. 1999. Qualitative traits and shelf life in *Pagrus major* x *Dentex dentex* hybrids stored at refrigerated conditions and comparison with European gilthead seabream (*Sparus aurata*). In: Proceedings of 33^o International Symposium SIPZOO “New Species for Mediterranean aquaculture”. April 22–24, 1998, Alghero, Italy. Elsevier, pp. 329–336.
- Poli, B.M., Parisi, G., Zampacavallo, G., Mecatti, M., Lupi, P., Gualtieri, M. 2001. Quality outline of European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) reared in Italy: shelf life, edible yield, nutritional and dietetic traits. *Aquaculture* 202, 303–315.
- Poli, B.M., Parisi, G., Zampacavallo, F., Iurzan, M., Mecatti, P., Lupi Bonelli, A. 2003. Preliminary results on quality and quality changes in reared meagre (*Argyrosomus regius*): Body and fillet traits and freshness in refrigerated commercial-size fish. *Aquaculture International* 11, 301–311.
- Porta, J., Porta, M.J., Rodríguez, M.G., Alvarez, M.C. 2006. Development of a microsatellite multiplex PCR for Senegalese sole (*Solea senegalensis*) and its application to broodstock management. *Aquaculture* 256, 159–166.
- Porta, D., Porta, J.M., Porta, J., Andree, K., Duncan, N. 2010. Isolation and characterization of microsatellite loci from *Argyrosomus regius* (Asso,1801), unpublished (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).
- Powell, J., White, I., Guy, D., Brotherstone, S. 2008. Genetic parameters of production traits in Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Aquaculture* 274, 225–231.



-
- Prentice, E.F., Flagg, T.A., Mccutcheon, C.S. 1990. Feasibility of using Implantable Passive Integrated Transponder PIT tags in Salmonids. American Fisheries Society Symposium 7, 317–322.
- Presa, P., Guyomard, R. 1996. Conservation of microsatellites in three species of salmonids. Journal of Fish Biology 49, 1326–1329.
- Primmer, C., Mpiller, R.A., Ellercneh, P. 1995. Resolving genetic relationships with microsatellite markers: a parentage testing system for the swallow *Hirundo rustica*. Molecular Ecology. 4, 493–498.
- Pruett, C.L., Saillant, E., Renshaw, M.A., Patton, J.C., Rexroad, C.E., Gold, J.R. 2005. Microsatellite DNA markers for population- genetic studies and parentage assignment in cobia, *Rachycentron canadum*. Molecular Ecology Notes 5, 84–86.
- Quabius, E. S, Krupp, G., Secombes, C. J. 2005. Polychlorinated biphenyl 126 affects expression of genes involved in stress–immune interaction in primary cultures of rainbow trout anterior kidney cells. Environmental Toxicology and Chemistry 24 (12), 3053–3060.
- Quartararo, N., Bell, J.D. 1992. Effect of intraperitoneal passive implantable transponder (PIT) tags on the growth and survival of juvenile snapper, *Pagrus auratus* (Bloch and Schneider). Aquaculture and Fisheries Management 23, 543–548.
- Quéméner, L. 2002. Le maigre commun (*Argyrosomus regius*). Biologie, pêche, marche et potential aquacole. Éditions IFREMER, Plouzané, France. 32 pp.



- Quéro, J.C., Vayne, J.J. 1987. Le maigre, *Argyrosomus regius* (Asso, 1801) (Pisces, Perciformes, Sciaenidae) du Golfe de Gascogne et des eaux plus septentrionales. *Revue des Travaux de l'Institut des Pêches maritimes* 49, pp 35–66.
- Quéro, J.C. 1989. Le maigre, *Argyrosomus regius* (Asso) (Pisces, Sciaenidae) en Méditerranée occidentale. *Bulletin de la Société zoologique de France* 14, pp 81–89.
- Quinton, C., McMillan, I., Glebe, B., 2005. Development of an Atlantic salmon (*Salmo salar*) genetic improvement program: genetic parameters of Harvest body weight and carcass quality traits estimated with animal models. *Aquaculture* 247, 211–217.
- Renshaw, M.A., Saillant, E., Bradfield, S.C., Gold, J.R. 2006. Microsatellite multiplex panels for genetic studies of three species of marine fishes: red drum (*Sciaenops ocellatus*), red snapper (*Lutjanus campechanus*), and cobia (*Rachycentron canadum*). *Aquaculture* 253, 731–735.
- 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. Sci.* 128, 92–100.
- Rius-Vilarrasa, E., Bünger L, Brotherstone, S., Matthews, K.R., Haresign, W., Davies, M., Macfarlane, J.M., Roehe, R. 2009. Genetic parameters for carcass composition and performance data in crossbred lambs measured by Video Image Analysis. *Meat Science* 82, 94–100.



-
- Rogers, S.M., Marchand, M.H., Bernatchez, L. 2004. Isolation, characterization and cross-salmonid amplification of 31 microsatellite loci in the lake whitefish (*Coregonus clupeaformis*, Mitchill). *Molecular Ecology Notes* 4, 89–92.
- Roo, J., Hernández-Cruz, C.M., Borrero, C., Schuchardt, D., Fernández-Palacios, H. 2010. Effect of larval density and feeding sequence on meagre (*Argyrosomus regius*; Asso, 1801) larval rearing. *Aquaculture* 302, 82–88.
- Rutten, M.J.M., Bovenhuis, H., Komana, H. 2005. Genetic parameters for fillet traits and body measurements in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus* L.). *Aquaculture* 246, 125–132.
- Rye, M., Refstie, T. 1995. Phenotypic and genetic parameters of body size traits in Atlantic salmon *Salmon salar* L. *Aquaculture Research* 26, 875– 885.
- Rye, M., Gjerde, B. 1996. Phenotypic and genetic parameters of body composition traits and flesh color Atlantic salmon, *Salmo salar* L. *Aquaculture Research* 27, 121–133.
- Rye, M, Gjerde, B., Gjedrem, T. 2010. Genetic improvement programs for aquaculture species in developed countries. In: *Proceedings of the 9th World Congress on Genetics Applied to Livestock Production*, Leipzig, Germany, 1-6 August. No. 0963.
- 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., Renshaw, M.A., Gatlin, D.M., Neill, W.H., Vega, R.R., Gold, J. R. 2009. An experimental assessment of genetic tagging and founder representation in hatchery-reared red drum (*Sciaenops ocellatus*) used in stock enhancement. *Journal of Applied Ichthyology* 25, 108–113.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T. 1989. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, second ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Sánchez, J.J., Borsting, C., Hallenberg, C., Buchard, A., Hernández, A., Morling, N. 2003. Multiplex PCR and minisequencing of SNPs—a model with 35 Y chromosome SNPs. *Forensic Science International* 137, 74–84.
- Schuchardt, D., Fernández-palacios, H., Roo, J., Hernández-cruz, C.M. 2007. Estabulación y mantenimiento de un stock de reproductores de corvina (*Argyrosomus regius*, Asso, 1801) en Canarias. XI Congreso Nacional de Acuicultura, Xunta de Galicia. pp. 727–730.
- Sekino, M., Sugaya, T., Hara, M., Taniguchi, N. 2004. Relatedness inferred from microsatellite genotypes as a tool for broodstock management of Japanese flounder *Paralichthys olivaceus*. *Aquaculture* 233(1-4), 163–172.
- Serezli, R., Basaran, F., Gungor Muhtaroglu, C., Kaymakci Basaran, A. 2011. Effects of 2-phenoxyethanol anaesthesia on juvenile meagre (*Argyrosomus regius*). *J. Appl. Ichthy.* DOI: 10.1111/j.1439-0426.2011.01771.x.
- Severi, W., Rantin, F.T., Fernandes, M.N. 1997. Respiratory gill surface of the serrasalmid fish, *Piaractusmesopotamicus*. *Journal of Fish Biology* 50, 127–136.



- Sigourney, D.B., Horton, G.E. 2005. Electroshocking and PIT tagging of juvenile Atlantic salmon: Are there interactive effects on growth and survival? *North American Journal of Fisheries Management* 25, 1016–1021.
- Soula, M., Navarro, A., Zamorano, M.J., Negrin, N., Afonso, J.M. 2009. Evaluation of PIT system as a method to tag fingerling of meager (*Argyrosomus regius*): effects on Growth, Mortality and tag loss. *Proceeding of the Poster Xth International Symposium on Genetics in Aquaculture*. 22-26 June, 2009, Bangkok, Thailand.
- Soula, M., Zamorano, M. J., Navarro, A., Sánchez, J.J., Neil, D., Alejandro, G., Afonso, J.M. 2011. Diseño de dos nuevas PCRs múltiplex para corvina (*Argyrosomus regius*). *Proceeding of the XIII Congreso Nacional de Acuicultura*. 21–24, 2011 Barcelona, Spain.
- Soula, M., Navarro, N., Hildebrandt, S., Zamorano, M.J., Roo, J., Hernández-Cruz, C.M., Afonso, J.M. 2012. Evaluation of VIE (Visible Implant Elastomer) and PIT (Passive Integrated Transponder) physical tagging systems for the identification of red porgy fingerlings (*Pagrus pagrus*). *Aquaculture International* 20, 571–583.
- Stegeman, J.J., Hahn, M.E. 1994. Biochemistry and molecular biology of monooxygenases: current perspectives on forms, functions, and regulation of cytochrome P450 in aquatic species. In: Malins DC, Ostrander GK, editors. *Aquatic toxicology*. Boca Raton: Lewis Publishers, 87–203.
- Summers, K., Amos, W. 1996. Behavioral, ecological, and molecular genetic analyses of reproductive strategies in the Amazonian dart-poison frog, *Dendrobates ventrimaculatus*. *Behaviour Ecology* 8, 260–267.



- Tinoco, A.B., Rodríguez-Rúa, A., Calvo, A., Cárdenas, S. 2009. Effects of salinity on growth and feeding of juvenile meagre, *Argyrosomus regius* (Asso, 1801). En Aquaculture Europe 2009: Norwegian University of Science and Technology, European Aquaculture Society y Nor-Fishing Foundation, Trondheim, Noruega, 14–17 de Agosto de 2009. Pp 125–126
- Turner, T.F., Richardson, L.R. Gold, J.R. 1998. Polymorphic microsatellite DNA markers in red drum (*Sciaenops ocellatus*). *Molecular Ecology* 7, 1771–1773.
- 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., Dupont-Nivet, M., Haffray, P., Chavanne, H., Cenadelli, S., Parati, K., Vidal, M.-O., Vergnet, A., Chatain, B. 2009. Response to domestication and selection for growth in European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) in separate and mixed tanks. *Aquaculture* 286, 20–27.
- Vieira, V.L.A., 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.). *Aquaculture* 272, 100–109.
- Wagner, A.P., Creel, S., Kalinowski, S.T. 2006. Estimating relatedness and relationships using microsatellite loci with null alleles. *Heredity* 97, 336–345.



- Wattier R., Engel C.R., Saumitou P., Valero M. 1998. Short allele dominance as a source of heterozygote deficiency at microsatellite loci: Experimental evidence at the dinucleotide locus *gv1ct* in *Gracilaria gracilis* (Rhodophyta). *Molecular Ecology* 7, 1569–1573.
- Webb, M. A. H., Allert, J. A., Kappenman, K. M., Marcos, J., Feist, G. W., Schreck, C. B. Shackleton, C. H. 2007. Identification of plasma glucocorticoids in pallid sturgeon in response to stress. *General and Comparative Endocrinology* 154, 98–104.
- Wesmajervi, M.S., Westgaard, J.I., Delghandi, M. 2006. Evaluation of a novel pentaplex microsatellite marker system for paternity studies in Atlantic cod (*Gadus morhua* L.). *Aquaculture Research* 37, 1195–1201.
- Wuertz, S., Lutz, I., Gessner, J., Loeschau, P., Hogans, B., Kirschbaum, F., Kloas, W., 2006. The influence of rearing density as environmental stressor on cortisol response of shortnose sturgeon (*Acipenser brevirostrum*). *Journal of Applied Ichthyology* 22, 269–273.
- 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. *Nucleotides Acids Research* 30, 131–135.
- Yutao, L., Kanokpan, W., Mudagandu, S., Jennifer, R., Leanne, Di., Jennifer, M., Nigel, P., Greg, C., Russell, E. L. 2007. Development of two microsatellite multiplex systems for black tiger shrimp *Penaeus monodon* and its application in genetic diversity study for two populations. *Aquaculture* 266 (1-4), 279–288.



BIBLIOGRAFÍA

Zydlewski, G. B., Zydlewski, J., Johnson, J. 2009. Patterns of migration and residency in coastal cutthroat trout *Oncorhynchus clarkii clarkii* from two tributaries of the lower Columbia River. *Journal of Fish Biology* 75, 203–222.



ANEXOS

Protocolo de extracción de ADN

Material y Equipamiento:

- ✓ Muestra de tejido
- ✓ Soluciones para la digestión.
- ✓ Soluciones para la precipitación.
- ✓ Centrífuga
- ✓ Estufa

Procedimiento:

1. Preparación del Tampón de digestión:

En un tubo de 10ml (25 muestras):

- 500 µl SDS al 20%
- 50 µl Proteínasa K al 100 mM
- 9.450 µl Stock (Tris, EDTA, NaCl)

Concentraciones finales:

- Tris : 50 mM
- EDTA: 100 mM
- NaCl: 100 mM
- SDS: 1%
- Proteínasa K: 100µg/ml

2. Tomar una muestra de aproximadamente 50mg de aleta e introducirla en un eppendorf de 1,5ml.

3. Añadir 400 µl de tampón de extracción a cada una de las muestras. Incubar a 50°C en agitación durante el tiempo suficiente para que se produzca la digestión de todo el tejido (1-3h o toda la noche).
4. Añadir 400 µl de fenol equilibrado con Tris 0,1 M (pH: 8,0) (fase inferior).
5. Agitar manualmente durante 10 minutos.
6. Centrifugar durante 15 min. a 8.000 g.
7. Recuperar la fase superior y transferirla a un eppendorf limpio.
8. Añadir 1 volumen (aproximadamente 300 µl) de Cloroformo: Alcohol isoamílico (24:1).
9. Agitar manualmente durante 10 minutos.
10. Centrifugar durante 15 min. a 8.000 g.
11. Recuperar la fase superior y transferirla a un eppendorf limpio.
12. Añadir 1 volumen (aproximadamente 300 µl) de isopropanol frío y agitar suavemente. El caso de utilizar etanol, usar 2 volúmenes, que junto a la sal y el frío precipitan el ADN.
13. Dejar a 4°C durante una hora como mínimo.
14. Centrifugar 15 min. a 12.000 g. Cuanto más se centrifugue más rendimiento se obtendrá. Colocar los tubos con la articulación de la tapa hacia fuera para saber donde quedará el ADN.
15. Recoger y tirar el sobrenadante. Apuntar al lado contrario de la articulación de la tapa, para no arrastrar ADN.
16. Añadir 400 µl de etanol al 70% para lavar el sedimento.
17. Centrifugar 5 min. a 12.000 g.
18. Volver a retirar el sobrenadante del mismo modo que en el paso 14.
19. Secar perfectamente 15 min. a 30°C.
20. Resuspender en 50 µl de TE 1X.

Protocolo de determinación de la cantidad de humedad

1. Descongelar el filete y tritararlo completamente. De cada filete se analizan dos muestras.
2. Poner un crisol de cerámica por muestra en la estufa a 110°C durante unas horas para que quede bien seco.
3. Atemperar el crisol en el desecador durante unos 45 min.
4. Sacar el crisol y numerarlo por la parte de abajo a lápiz. Pesarlo (peso crisol), añadir aproximadamente 4 g de muestra y volver a pesarlo (peso crisol + muestra fresca). (Los 4 g no pueden ocupar la totalidad del crisol, pues cuando se queman, las cenizas aumentan de volumen, formándose burbujas y se pueden rebosar).
5. Secar en la estufa a 110°C durante 24 horas.
6. Atemperar el crisol en el desecador durante unos 15 min.
7. Pesar el crisol (peso crisol + muestra seca).
8. Determinar la cantidad de humedad por diferencia: $(\text{peso crisol} + \text{muestra fresca}) - (\text{peso crisol} + \text{muestra seca}) = (\text{peso humedad})$. Para expresarlo como porcentaje hace falta el peso de la muestra: $(\text{peso crisol} + \text{muestra fresca}) - (\text{peso crisol})$.
9. Este mismo crisol (peso crisol + muestra seca) se utilizará en el protocolo de determinación de la cantidad de cenizas.

Protocolo de determinación de la cantidad de ceniza

1. Calentar el crisol con la muestra seca utilizada en el análisis de la humedad en la mufla a 600°C durante 5 horas. Esperar unas 12 horas para que baje la temperatura antes de abrir la mufla.
2. Sacar con guantes térmicos el crisol con las cenizas.
3. Atemperar 45 min en el desecador.
4. Pesar el crisol (peso crisol + cenizas).
5. Determinar la cantidad de cenizas por diferencia: $(\text{peso crisol} + \text{cenizas}) - (\text{peso crisol}) = (\text{peso cenizas})$. Para expresarlo como porcentaje hace falta el peso de la muestra: $(\text{peso crisol} + \text{muestra fresca}) - (\text{peso crisol})$.

Protocolo de determinación de lípidos

Aparataje: Soxhlet 1034, Estufa, Balanza

Material: Papel de filtro, Desecador, Cazos, Éter de petróleo

Día 1. Descongelar las muestras, pesar 20g de cada muestra por duplicado y meterlas en la estufa durante 24 horas Poner también papel de filtro para que se deseque y pierda la humedad que puede contener.

Día 2. Sacar las muestras, pesar 2g de las muestras secas y ponerlo en el papel de filtro y reponerlo en la estufa durante 24 horas.

Día 3. 1. Pesar el conjunto (peso muestra+ peso filtro).

2. Poner el termostato hasta que llegue a 100° C

3. Llenar los cazos hasta un poco más de la mitad con éter de petróleo

4. Colocar los papeles de filtros llenos de muestras (2 paquetes en cada uno de los tubos)

5. Llave abierta+posición *boiling* +evaporación (20min)

6. Llave abierta+posición *rising* +evaporación (40min).

7. Llave cerrado+encender la bomba de aire+posición *rinsing* +evaporación cerrada (20 min).

8. Recoger los paquetes y poner los en la estufa 24h

9. Recuperar el éter de petróleo

Día 4. Pesar los paquetes y hacer el cálculo: $((\text{peso muestra} + \text{peso filtro})_{\text{final}} - (\text{peso muestra} + \text{peso filtro})_{\text{inicial}}) / (\text{peso muestra} + \text{peso filtro})_{\text{final}}$.

Protocolo de determinación de colágeno total

1. Añadir aproximadamente 2 g de muestra en un tubo de ensayo de vidrio (Pesar el tubo, tarar, añadir la muestra y apuntar el peso).
2. Añadir 15 ml de ácido sulfúrico (solución 3 M) y dejar el tubo sin tapar en la estufa a 105°C durante 24 horas.
3. Filtrar el contenido del tubo pasándolo por un fonil de vidrio, con un filtro de papel whatman, a un matraz de 100 ml.
4. Añadir al tubo vacío 10 ml de la solución ácido sulfúrico 3M y volver a filtrar.
5. Enrasar con agua destilada y mezclar.
6. Transferir 4 ml de la solución filtrada a un tubo de plástico y taparlo.
7. Preparar la solución madre de hidroxiprolina (500 µg/ml): añadir 50 mg de hidroxiprolina a un matraz de 100 ml, añadir una gota de solución de ácido sulfúrico 3M y enrasar con agua destilada. Esta solución es estable 1 mes a 4°C.
8. Preparar los tubos de los estándares que constituirán la curva patrón, a partir de la solución madre de hidroxiprolina, con las siguientes concentraciones: 0 (blanco); 0,1; 0,2; 0,3; 0,5; 1; 1,5 y 2 µg/ml, y transferir 4 ml de cada una a un tubo de plástico.
9. Preparar la solución tampón: disolver 26 g de ácido cítrico monohidratado, 14 g de hidróxido de sodio y 78 g de sodio acetato monohidratado en 500 ml de agua destilada. Transferir a un matraz de un litro, añadir 250 ml de 1-propanol y enrasar con agua destilada. Debe estar a pH: 6,8 y es estable durante varias semanas a 4°C.
10. Preparar la solución cloramina T (inmediatamente antes de usar): disolver 1,41 g de p-Toluensulfonilcloramida Sódica (cloramina T), en 100 ml de la solución tampón (0,0141g clorT/ml tampón).

11. Añadir a cada tubo de muestra y de estándar, 2 ml de la solución cloramina T. Mezclar y dejarlos a temperatura ambiente durante 20 min.
12. Preparar la solución de color (en el día de su uso): Disolver 10 g de p-dimetilaminobenzaldehído (*Ehrlich's reagent*) en 35 ml de una solución de ácido perclórico al 60% y luego muy despacio añadir 65 ml de 2-propanol.
13. Añadir a cada tubo de muestra y de estándar, 2 ml de la solución de color, mezclar rápidamente y mantener los tubos a un baño de agua de 60°C durante 20 min.
14. Enfriar los tubos con agua fría y dejarlos durante 30 min a temperatura ambiente.
15. Leer una alícuota de cada tubo en el espectrofotómetro a 558 nm. Comparando las absorbancias con las de la curva patrón se obtienen las concentraciones de hidroxiprolina de cada tubo ($\mu\text{g/ml}$). Las cuales se multiplican x100 y se dividen por el peso de la muestra puesta en el tubo de ensayo, para obtener los μg de hidroxiprolina por g de muestra.

Protocolo análisis de imagen

La sesión fotográfica debe realizarse en un cuarto oscuro sin la influencia de luz externa.

1. **Disposición de la cámara fotográfica:** La cámara estará centrada con respecto a los fluorescentes (a 60 cm de distancia de cada fluorescente). La altura del soporte de la cámara desde el plano será de 39 cm. El objetivo de la cámara, en este caso, estará a 40 cm desde el borde inferior o superior de la mesa hasta el centro de la mesa, (ancho de la mesa de 80 cm). El enfoque el pez en línea horizontal (cabeza-cola).
2. **Disposición de la bandeja:** La bandeja irá centrada con respecto al objetivo de la cámara
3. **Disposición de los fluorescentes:** Se utilizarán 2 fluorescentes de 36"/89.46 cm, y 30 W. Dispuestos a cada lado de la cámara, iluminando al pez en dirección (cabeza- cola). La separación entre ambos fluorescentes será de 1.20 m. La altura de las luces desde plano es la siguiente:
 - luz izquierda: 20 cm
 - luz derecha: 26 cm
4. **Disposición del pez:**
 - Disposición ventral: Utilizar fondo rojo liso (bandeja), etiquetar los peces (numeración) en su cara lateral derecha, y poner otra etiqueta para identificar a cada pez sobre la bandeja. La orientación del pez tiene que ser la misma para todos los peces.

- Disposición dorsal: Utilizar fondo blanco liso (bandeja), etiquetar los peces (numeración) en su cara lateral derecha, y poner otra etiqueta para identificar a cada pez sobre la bandeja. La orientación del pez tiene ser la misma.

El procesado de las imágenes se realiza con el programa MATLAB, es un programa para realizar cálculos numéricos con *vectores* y *matrices*. De forma general, el procesado de las imágenes consiste en calcular una serie de medidas sobre el pez, que dependerán de si el pez se encuentra en posición ventral o dorsal.

Los datos de salidas del programa son:

1. Nombre de la imagen.
2. Área total del pez (cm²).
3. Longitud total del pez (cm).
4. Ancho máximo del pez (cm).
5. Ancho de la cola (cm). Hace referencia al ancho del estrecho de la cola.
6. Longitud desde la cabeza hasta el estrecho de la cola (cm).
7. Ancho de la cabeza (cm).
8. Área del filete (desde la línea de corte de la cabeza hasta la cola) (cm²).
9. Longitud estándar (desde la cabeza hasta la aleta de cola) (cm).
10. Longitud máxima del filete (desde la línea de corte de la cabeza hasta la cola) (cm).
11. Ancho máximo del filete (cm).

12. Excentricidad ($0 < e < 1$). Da una idea de lo ovalado que puede ser el pez. Se obtiene desde la cabeza hasta el estrecho de la cola. Si $e=0$ la forma del pez se asemeja a un círculo, y si vale 1 se asemeja a una línea.
13. Flag_error: da información sobre algunos errores detectados en el procesado de las imágenes. Tipos: error de área, error de estimación de cola, error del programa,etc.
14. Anchuras verticales equiespaciadas de toda la dimensión del pez (5 anchuras en (cm). Puntos blancos sobre el contorno del pez en la imagen mostrada debajo.
15. Fecha.

