

## Anexo I

Dr. Daniel Montero Vítors, COORDINADOR DEL PROGRAMA DE DOCTORADO **ACUICULTURA: PRODUCCIÓN CONTROLADA DE ANIMALES ACUÁTICOS**, DE LA UNIVERSIDAD DE LAS PALMAS DE GRAN CANARIA,

### **CERTIFICA,**

Que la Comisión Académica del programa de doctorado, en su sesión, tomó el acuerdo de dar el consentimiento para su tramitación, a la tesis doctoral titulada **“ESTUDIO DE LA SEGUNDA GENERACIÓN DE DORADA (*Sparus aurata* L.) DEL PROGRAMA DE MEJORA GENÉTICA PROGENSE® PARA CARACTERES DE INTERÉS COMERCIAL E IMPLEMENTACIÓN DE NUEVAS TECNOLOGÍAS FACILITADORAS, BAJO CONDICIONES INDUSTRIALES DE CULTIVO”**

Presentada por el doctorando D **ISLAM SAID ELALFY ELKHOLY** y dirigida por D. **JUAN MANUEL AFONSO LOPEZ** y D. **MANUEL MANCHADO CAMPAÑA**.

Y para que así conste, y a efectos de lo previsto en el Artº 6 del Reglamento para la elaboración, defensa, tribunal y evaluación de tesis doctorales de la Universidad de Las Palmas de Gran Canaria, firmo la presente en Las Palmas de Gran Canaria.

## Anexo I

D. Rafael Robaina Romero, VICERRECTOR DE TITULOS Y DOCTORADO, DE LA UNIVERSIDAD DE LAS PALMAS DE GRAN CANARIA,

### **CERTIFICA,**

Que la Comisión Académica del programa de doctorado **ACUICULTURA: PRODUCCIÓN CONTROLADA DE ANIMALES ACUATICOS**, tomó el acuerdo de dar el consentimiento para su tramitación, a la tesis doctoral titulada “**ESTUDIO DE LA SEGUNDA GENERACIÓN DE DORADA (*Sparus aurata* L.) DEL PROGRAMA DE MEJORA GENÉTICA PROGENSE<sup>®</sup> PARA CARACTERES DE INTERÉS COMERCIAL E IMPLEMENTACIÓN DE NUEVAS TECNOLOGÍAS FACILITADORAS, BAJO CONDICIONES INDUSTRIALES DE CULTIVO**”

Presentada por el doctorando D. **ISLAM SAID ELALFY ELKHOLY**, y dirigida por D. **JUAN MANUEL AFONSO LOPEZ** y D. **MANUEL MANCHADO CAMPAÑA**.

Y para que así conste, y a efectos de lo previsto en el Artº 6 del Reglamento para la elaboración, defensa, tribunal y evaluación de tesis doctorales de la Universidad de Las Palmas de Gran Canaria, firmo la presente en Las Palmas de Gran Canaria, a 20 de junio de dos mil dieciséis.



## Anexo II

UNIVERSIDAD DE LAS PALMAS DE GRAN CANARIA

INSTITUTO UNIVERSITARIO DE ACUICULTURA SOSTENIBLE Y  
ECOSISTEMAS MARINOS (IU-ECOQUA)

**Programa de Doctorado en Acuicultura: Producción  
Controlada de Animales Acuáticos**

**Título de la Tesis**

**“ESTUDIO DE LA SEGUNDA GENERACION DE DORADA (*Sparus aurata* L.) DEL  
PROGRAMA DE MEJORA GENÉTICA PROGENSE<sup>®</sup> PARA CARACTERES DE  
INTERÉS COMERCIAL E IMPLEMENTACIÓN DE NUEVAS TECNOLOGÍAS  
FACILITADORAS BAJO CONDICIONES INDUSTRIALES DE CULTIVO”**

Tesis Doctoral presentada por D. ISLAM SAID ELALFY ELKHOLY

Dirigida por el Dr. D. JUAN MANUEL AFONSO LOPEZ

Dirigida por el Dr. D. MANUEL MANCHADO CAMPAÑA

Las Palmas de Gran Canaria, a 10 de Junio de 2016



**ECOQUA**  
WWW.ECOQUA.EU

## Annex I

Dr. Daniel Montero, COORDINATOR OF THE DOCTORAL PROGRAM,  
**AQUACULTURE: CONTROLLED PRODUCTION OF AQUATIC ANIMALS**  
OF THE UNIVERSITY OF LAS PALMAS DE GRAN CANARIA,

### **CERTIFIES,**

That the Academic Committee of the doctoral program, at its meeting, took the agreement to give consent for processing, the doctoral thesis entitled “**STUDY OF THE SECOND GENERATION OF GILTHEAD SEA BREAM (*Sparus aurata* L.) WITHIN THE GENETIC IMPROVEMENT PROGRAM PROGENSEA® FOR COMMERCIAL INTEREST TRAITS AND IMPLEMENTATION OF NEW INDUSTRIAL ENABLING TECHNOLOGIES, UNDER CULTURE CONDITIONS**”

Presented by Mr. **ISLAM SAID ELALFY ELKHOLY** and directed by Dr. **JUAN MANUEL AFONSO LOPEZ** and Dr. **MANUEL MANCHADO CAMPAÑA**.

And for the record, and for the purposes of the provisions of the Artº 6 of Regulation for the preparation, defence, court and evaluation of doctoral theses at the University of Las Palmas de gran canaria, I sign this in Las Palmas de Gran Canaria, at June, 20th 2016

## Annex I

Mr. Rafael Robaina Romero VICECHANCELLOR OF DEGREE AND POSTGRADUATE OF THE UNIVERSITY OF LAS PALMAS DE GRAN CANARIA,

### **CERTIFICAT,**

That the Academic Committee of the doctoral program **AQUACULTURE: CONTROLLED PRODUCTION OF AQUATIC ANIMALS**, took the agreement to give consent for processing, the doctoral thesis entitled “**STUDY OF THE SECOND GENERATION OF GILTHEAD SEA BREAM (*Sparus aurata* L.) WITHIN THE GENETIC IMPROVEMENT PROGRAM PROGENSEA® FOR COMMERCIAL INTEREST TRAITS AND IMPLEMENTATION OF NEW INDUSTRIAL ENABLING TECHNOLOGIES, UNDER CULTURE CONDITIONS**”

Presented by Mr. **ISLAM SAID ELALFY ELKHOLY**, and directed by Dr. **JUAN MANUEL AFONSO LOPEZ** and Dr. **MANUEL MANCHADO CAMPAÑA**.

And for the record, and for the purposes of the provisions of the Artº 6 of Regulation for the preparation, defence, court and evaluation of doctoral theses at the University of Las Palmas de Gran Canaria, I sign this at Las Palmas de Gran Canaria, 20<sup>th</sup> June, two thousand and sixteen.



## Annex II

University of Las Palmas DE GRAN CANARIA

**UNIVERSITY INSTITUTE OF SUSTAINABLE AQUACULTURE  
AND MARINE ECOSYSTEMS (IU-EcoAqua)**

### **Doctoral Program in Aquaculture: Controlled Production of Aquatic Animal**

#### **Thesis title**

**“STUDY OF THE SECOND GENERATION OF GILTHEAD SEA BREAM  
(*Sparus aurata* L.) WITHIN THE GENETIC IMPROVEMENT PROGRAM  
PROGENSA® FOR COMMERCIAL INTEREST TRAITS AND  
IMPLEMENTATION OF NEW INDUSTRIAL ENABLING TECHNOLOGIES  
UNDER CULTURE CONDITIONS”**

Doctoral thesis presented by **ISLAM SAID ELALFY ELKHOLY**

Directed by Dr. **JUAN MANUEL AFONSO LOPEZ**

Directed by Dr. **MANUEL MANCHADO CAMPAÑA**

**Las Palmas de Gran Canaria, 10th June 2016.**



**ECOAQUA**  
WWW.ECOAQUA.EU

*To*

*My sweetly wife SELWAN,  
my handsome son ADAM  
and my beautiful daughter  
LAMAR*



## Acknowledgment

*“All praise is due to Allah, the Lord of the Worlds, the Beneficent, the Merciful”*

*I wish to express my gratitude to the culture affairs and missions sector (Ministry of Higher Education), Egypt, which gave me this opportunity to improve my knowledge in the aquaculture field through the grant that presented to me to study my doctorate at the University of Las Palmas de gran canaria.*

*I would like to express my special appreciation and thanks to PhD advisors Professors, Juan Manuel and Manuel Manchado, you have been a tremendous mentor for me. I would like to thank you for encouraging my research and for allowing me to grow as a research scientist. Your advice on both research as well as on my career have been priceless. Juan is someone you will instantly love and never forget once you meet him. He's the funniest advisor and one of the smartest people I know. I hope that I could be as lively, enthusiastic, and energetic as Juan and to someday be able to command an audience as well as he can. Manuel has been supportive and has given me the freedom to pursue various projects without objection, He has also provided insightful discussions about the research. Thanks Manuel for your help, your advices and your sympathy were always useful for me. All of you have been there to support me when I recruited patients and collected data for my Ph.D. thesis.*

*I am also very grateful to María Jesús Zamorano Serrano for her scientific advice and knowledge and many insightful discussions and suggestions. She is my primary resource for getting my science questions answered and was instrumental in helping me cranked out this thesis.*

*Thanks also to all staff of the GIA, technicians, researchers and scholars to a greater or lesser extent have collaborated in the realization of this document, either for the help in sampling, analysis of samples, or in counseling scientific*

*I thank all the present members of the SABE who have supported me during all the period of my work.*

*To all my partners of the marine animal genetic laboratory, Ana Navarro though you are no longer, thank your guide in my early days in the laboratory, Davinia thanks for your support, thank you for your clarity, order and sincerity, Suk, Ahmed and Guaci for their advices and practical help.*

*To all my professors in Egypt who have always supported me, Prof. Dr. Nour, Prof. Dr. Atya, Prof. Dr. Elsayed, Dr. Mekawi, Dr. Eltahawi, Dr. Kotb, Dr. Mohsen, Dr. Saber Dr. Salah, Dr. Elshafey, and Dr. Asmaa Elnagar. And to my colleagues Amin and May.*

*while studying abroad, away from my home country «land», I have never forgotten my close friends, whom we have spent the happiest and unforgettable moments together, Emad Abokela (Alkaed), A. Harb (Abo Nasab), A. Helal ( Elnegm) Emad Fawzy (El3zomy), A. Elnagar (Sadeky), A. Alaam (Ebn Elkaberra), Hesham (Elexlance), A. Elghanam ( El7nayen), Kareem (Karamela), A. Mabrok (Elkbeer), Matared (Mata),Walid (Elmo7taram), and Shehata (Shehta).*

*To my dearest parents ever; my father and my mother, you are the best parents in the world, you're reflecting the love that ought to be given to others without asking or even waiting for anything in return. In addition to, being supported always by you, in all of my life's aspects. Surely, without the support of my brother Mohamed, and my sisters*

*Walaa and Lamiaa, I would have never reached my position I am in now, or even being here.*

*I want give special thanks to my mother-in-law, who has never been a mother-in-law to me, I deeply feel that she is my mother for such a precious present that she has gifted me, this gift is her daughter.. My love.. My life and my wife..... SELWAN..... Thank you for supporting me without waiting for anything in return, without you I could have never done my project. Thank you for your patience with me, your caring about everything while me being busy. Thank you for your tolerance when I always used to tell you; "In one hour I will be home" while waiting me for the double of that time. There is a wisdom line that says "Behind every successful man, a great woman" Maybe I am not a great man, but surely you are a great women. Finally I want to thank you for everything. I know that you are totally sure that, thank you is not that word that can express how thankful I am.*

*Finally, and in a special place in this part, I want to say to my handsome son and my beautiful daughter that Allah has gifted me; Dear ADAM and LAMAR. Recently, I was too far from you and it has not been that easy for me, really your love is the motivation that gives me the power to go on in life. So, please forgive me for this distance we have had between us, and the difficulties you had been through. I do promise that I will compensate you for all these days.*



## **Funding Sources**

This work was funded by the coordinated research national project entitled "Implementation of INNOvative TECHnologies for genetic improvement in Senegalese sole (*Solea senegalensis*) and gilthead sea bream (*Sparus aurata*) for the optimization of industrial production (INNOTECCSS)", awarded by the National Research Institute for Agricultural and Food Technology (INIA), Spain. As well as the doctoral grant awarded by the culture affairs and missions sector (Ministry of Higher Education), Egypt.



# DOCTORAL THESIS

**STUDY OF THE SECOND GENERATION OF  
GILTHEAD SEA BREAM (*Sparus aurata* L.)  
WITHIN THE GENETIC IMPROVEMENT  
PROGRAM PROGENSEA® FOR COMMERCIAL  
INTEREST TRAITS AND IMPLEMENTATION OF  
NEW INDUSTRIAL ENABLING TECHNOLOGIES,  
UNDER CULTURE CONDITIONS**

**ISLAM SAID ELALFY**

**Las Palmas de Gran Canaria**

**2016.**



	<b>Page</b>
<b>Content</b> .....	<b>I</b>
<b>List of Figures</b> .....	<b>III</b>
<b>List of Tables</b> .....	<b>IV</b>
<b>Abstract</b> .....	<b>1</b>
<b>1 General Introduction</b> .....	<b>5</b>
1-1 Gilthead sea bream ( <i>Sparus aurata</i> L.).....	7
1-1-1 Taxonomy .....	7
1-1-2 Family descriptions .....	7
1-1-3 Biology and morphological characteristics of the gilthead sea bream .....	8
1-1-4 Geographical distribution and habitat .....	9
1-1-5 Food and growth .....	9
1-1-6 Reproduction .....	9
1-1-7 History of culture .....	10
1-1-8 Current status of the culture .....	10
1-2 Genetic and its applications in aquaculture .....	13
1-2-1 Selective breeding .....	13
1-2-2 Genetic markers.....	15
1-2-3 Microsatellites markers .....	16
1-2-4 Multiplex polymerase chain reactions .....	17
1-2-5 Relationship matrix and family contribution .....	19
1-2-6 Genotype x environment interaction .....	20
1-3 State of Selective breeding applications in aquaculture .....	20
1-4 State of genetic improvement in gilthead sea bream .....	23
1-5 Important economic traits in gilthead sea bream in genetic improvement programs .....	24
1-6 Justification and aims .....	26
<b>2 Optimization of factorial familiar structure in Gilthead sea bream (<i>Sparus aurata</i> L.) by using consecutive mass-spawning, under industrial condition</b> .....	<b>29</b>
2-1 Abstract .....	31
2-2 Introduction .....	32
2-3 Materials and methods .....	35

# CONTENT

---

2-3-1 Biological material and traits .....	35
2-3-2 Genotyping and parental assignment .....	36
2-4 Results .....	38
2-4-1 Phenotyping .....	38
2-4-2 Genotyping and parental assignment .....	38
2-4-3 Family contributions .....	39
2-5 Discussion .....	44
2-5-1 Phenotyping .....	44
2-5-2 Mass-spawning and parental assignment.....	45
2-5-3 Family contributions .....	46
<b>3 Estimates of genetic parameters for new noninvasive technological traits, their relationships with essential biological traits and GxE interactions in oceanic cages and estuaries on gilthead sea bream (<i>Sparus aurata</i> L.) .....</b>	<b>51</b>
3-1 Abstract .....	53
3-2 Introduction .....	55
3-3 Materials and methods .....	61
3-3-1 Biological material .....	61
3-3-2 Analyzed traits .....	62
3-3-3 Genotyping and familial assignments .....	64
3-3-4 Data analysis .....	64
3-4 Results .....	66
3-4-1 Genotyping and parental assignment .....	66
3-4-2 Phenotyping .....	66
3-4-3 Heritabilities and correlations .....	67
3-4-4 Genotype - environment interaction .....	70
3-5 Discussion .....	71
3-5-1 Genotyping and parental assignment .....	71
3-5-2 Phenotyping .....	72
3-5-3 Heritabilities and correlations .....	74
3-5-4 Genotype X environment interaction .....	79
<b>4 Conclusions .....</b>	<b>81</b>
<b>5 References .....</b>	<b>85</b>
<b>Anexo. Resumen en español .....</b>	<b>109</b>

List of Figures	page
• <b>Figure 1-1.</b> Gilthead sea bream specimen .....	8
• <b>Figure 1-2.</b> Progression of gilthead sea bream aquaculture production in the Mediterranean area and in the rest of the World from 1984 to 2014 (APROMAR, 2015).....	11
• <b>Figure 1-3.</b> Main producer countries of gilthead sea bream (FAO 2015).....	11
• <b>Figure 1-4.</b> Distribution of the gilthead sea bream productions in Spain for Autonomous regions in 2014 (%) (APROMAR, 2015).....	12
• <b>Figure 2-1.</b> Family contributions under the 2DL model for PCTM <sub>2DL</sub> .....	42
• <b>Figure 2-2.</b> Family contributions under the 4DL model for PCTM <sub>4DL</sub> .....	42
• <b>Figure 2-3.</b> Family contributions under the 2DL model for CSUR <sub>2DL</sub> .....	43
• <b>Figure 2-4.</b> Family contributions under the 4DL model for IFAPA <sub>4DL</sub> . .....	43
• <b>Figure 3-1.</b> Automatically detected points by IMAFISH_ML software. Lateral view, for the determination of noninvasive technological traits of gilthead sea bream: points x1,x2, x3, x4, x5, x6 of the anteroposterior axis will be used to determine longitudinal traits; y1, y2, y3, y4 and a, b, c, d, e are dorsoventral axes, that will be used to determine height traits. ....	63

List of Tables	page
<ul style="list-style-type: none"> <li>● <b>Table 1-1.</b> Number of programs, number of families per program and average of number of traits selected in each program in different aquaculture species (modified from Neira, 2010, Rye <i>et al.</i>, 2010 and Gjedrem <i>et al.</i>, 2012). ....22</li> </ul>	22
<ul style="list-style-type: none"> <li>● <b>Table 2-1.</b> Phenotypic results for body weight, fork length, condition factor and specific growth rate (SGR) (mean <math>\pm</math> standard deviation), and number of fish analyzed (N), for gilthead sea bream at harvest size in each facility (PCTM, Parque Científico Tecnológico Marino; IFAPA, Instituto de Investigación y Formación Agraria y Pesquera; PLV2001, Playa de Vargas 2001 S.L. Company; CANEXMAR, Canarias de Explotaciones Marinas S.L.; PIMSA, Pesquerías Isla Mayor S.A.; CULTMAR, Cultivos Marinos del Maresme S.A.; SADM, Servicios Atuneros del Mediterráneo S.L.). Three mass-spawning models were used: 1DS; one-day spawning, small scale. 1DL; one-day spawning, large scale. 2DL; two-days spawning, large scale. 4DL; four-days spawning ,large scale. ....39</li> </ul>	39
<ul style="list-style-type: none"> <li>● <b>Table 2-2.</b> The total number of breeders (tB), number of contributors breeders (cB) to the spawning in each batch and sex, and the number of Full-sib (FS) and Half- sib (HS) families. nd, not-determined.....40</li> </ul>	40
<ul style="list-style-type: none"> <li>● <b>Table 2-3.</b> Statistical data for breeders and family production for 1DL, 2DL and 4DL models. Estimate of Effective size, Percentages of breeders contributing to the offspring. Number of families per breeder, average offspring per FS and HS family, offspring per HS paternal (p) and maternal (m)and the Coefficient of Variation (CV) for the number offspring per family under each spawning model. ....41</li> </ul>	41
<ul style="list-style-type: none"> <li>● <b>Table 3-1.</b> The measured traits by IMAFISH_ML software. ....63</li> </ul>	63
<ul style="list-style-type: none"> <li>● <b>Table 3-2.</b> Phenotypic result for growth, carcass, flesh composition and noninvasive technological traits (mean<math>\pm</math> standard error), for gilthead sea bream at harvest size after growth-out in oceanic-cage or in the estuary pond facilities .....67</li> </ul>	67

## LIST OF TABLES

---

- **Table 3-3.** Phenotypic correlations (below the diagonal), genetic correlations (above the diagonal, value  $\pm$  standard error), and heritabilities (in bold at the diagonal, value  $\pm$  standard error) for growth, carcass, flesh composition and technological traits in gilthead sea bream, at harvest size. .... 69
- **Table 3-4.** Genotype-environment interaction for growth, carcass, flesh composition and technological traits in gilthead sea bream at harvest size, and reared in cage and estuary, quantified by genetic correlation (value  $\pm$  standard error)..... 70



Gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.) is one of the most important species in the Mediterranean aquaculture. In the last quinquennium, implementation of genetic improvement programs has drawn the attention of gilthead sea bream producers to maintain a sustained growth in a competitive way. Although the organization of the industrial production based on genetic criteria increases the production costs, and at the beginning shows low genetic progress rate in short term, the genetic improvements provide a tool for a continuous, cumulative and permanent growth in the industry. The aim of the present study was to study of the second generation of gilthead sea bream, within the genetic improvement program PROGENSEA<sup>®</sup>, for implementation and studying new non-invasive technological traits (Key Enabling Technologies; KET's), and family contributions by managing of broodstocks through different models. Genetic correlations between KET's and biological and commercial interest traits were considered, under industrial culture conditions, in order to identify new massive, numerous, precise and economical methodologies for genetic evaluations, at industrial scale. Genotype – Environment interactions were also studied for KET's and biological traits, in two culturing systems; cages and estuaries.

Three different spawning models were implemented, according their number of spawning days. One (small scale 1DS, and large scale 1DL), two (2DL) and four (4DL) consecutive days under industrial conditions, in order to optimize the factorial familiar structure by using consecutive mass-spawnings. All batches were cultured in industrial-like facilities with different numbers of breeders, sex ratio, and under similar culturing conditions. At sampling time, growth traits were estimated through body weight, fork length, condition factor and specific growth rate. Genotyping and parental assignment were inferred by using microsatellite markers in multiplexes PCR, inter-specific (RimA) and specific (SMsa1).

In the 1DS model, three independent lots of breeders were constituted, from which only one batch was obtained from each one. A total of 18 breeders were used in the three broodstocks. Only 17 breeders spawned (94%), to produce a total of 21 FS families and 16 HS families (maternal or paternal). At the 1DL model, with 66 breeders, only 28 fish (42 %), 17 females and 11 males, contributed to the spawning. A total 89 FS families were represented and 24 HS families were constituted (8 paternal and 16 maternal). In the 2DL model, 139 breeders (67%) contributed to the spawning and established 297 FS families and 105 HS families (52 paternal and 53 maternal). In the 4DL model, constituted for 123 breeders, 83 fish (67%), 40 females and 43 males, contributed to produce a total of 201 FS

## ABSTRACT

---

families, where 59 were HS families (32 paternal and 27 maternal). The percentages of breeders contributing, in the second 2DL and 4DL, were similar, and clearly higher than the first model, 1DL. Regarding the total number of families per breeder, the 4DL model was the highest versus other tested models (1DL and 2DL).

In order to study the existence of additive genetic variability, between biological traits and their estimated counterparts by engineering technologies or technological traits, and studying their genetic correlations with other traits such as growth, performance and carcass, and flesh quality, progenies obtained from the selected bloodstocks in two research centers (PCTM – ULPGC; Canary Island, and IFAPA; Andalusia), belonging to the second generation of the genetic improvement program PROGENSEA<sup>®</sup> (named INNOTECCSS), were tagged by Passive Integrated Transponder (PIT), and mixed at the two research centers and two Spanish companies (ADSA; Canary Island and PIMSA; Andalusia). At harvest size, fish were sampled for growth, carcass, flesh quality and technological traits, these last by IMAFISH software. Pieces of caudal fin were taken and conserved in ethanol for pedigree analysis. Genotyping and parental assignment were inferred by genetic characterization of all breeders and offspring, by using the SMsa-1 multiplex PCR (Super Multiplex *Sparus aurata*), containing 11 specific microsatellite markers. Genetic parameters (heritability and genetic and phenotypic correlations) for growth, performance, meat quality and morphology traits were estimated. Genotype–environment interactions (GxE), at harvest size, were estimated by genetic correlation between two facilities (ADSA and PIMSA).

Heritability estimates ranged from 0.09 to 0.25 for growth traits, from 0.04 to 0.35 for carcass traits, from 0.08 to 0.27 for body composition traits, and the highest were reported by technological traits from 0.04 to 0.40. The genetic correlations for growth traits were mainly medium and high, for carcass traits were medium, and for body composition traits they were negative and high for moisture versus lipids, negative and low for proteins vs. moisture and lipids, and for the technological traits were high. Genetic correlations between carcass and growth traits, the estimations were medium and high, except for dressing (%) versus length which was low. Between body composition traits and growth traits were generally low-medium except with moisture, which were medium and negative. For technological traits, all genetic correlations were medium-high with growth traits. For carcass traits, they were high and low for fillet weight and dressing%, respectively, with all technological traits. For body composition, were mainly medium between proteins or lipids versus technological traits, and

medium and negative for moisture. Genetic correlations between technological traits with fillet weight and dressing %, were in general medium and low, respectively. For technological and carcass traits, were mainly low, and between technological traits and body composition, were positives with proteins or lipids, and low and negative with moisture.

Genetic-Environment interactions for all traits, at harvest size, were measured considering two culturing system (Cage in Canary island and estuary in Andalusia). They were mainly medium-high for all traits (between 0.46 and 1.00), except for FHA and FHB, which were low (0.05 and 0.16, respectively).

All these results reveal that the use of egg batches from consecutive days, under a mass-spawning approach, allows maximize the factorial familiar structure by a high number of breeders contributing to the offspring, a high number of families (full and half sibs families), an optimal control of inbreeding rate, and genetic gain, and it is recommendable and benefit to the design of genetic programs in the gilthead sea bream industry. The data also suggest that the new non-invasive technological traits (Key Enabling Technologies; KET's), present better additive genetic variation than biological traits, and higher precision, proposing new tools that can be used in breeding programs for gilthead sea bream, and that could lead a faster selection response to improve growth and morphology of the fish, through increased accuracy of breeding values and selection response rates.





# 1. GENERAL INTRODUCTION



## 1.1 Gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.)

### 1.1.1 Taxonomy

The gilthead seabream *Sparus aurata* (Linnaeus 1758) is classified taxonomically according to Greenwood *et al.* (1966) as follows:

**Phylum:** *Chordata*

**Superclass:** *Gnathostomata*

**Class:** *Osteichthyes*

**Subclass:** *Teleostei*

**Superorder:** *Acanthopterygi*

**Order:** *Perciformes*

**Suborder:** *Percoidei*

**Family:** *Sparidae*

**Genus:** *Sparus* (Cuvier, 1817)

**Species:** *Sparus aurata* (Linnaeus 1758)

### 1.1.2 Family descriptions

Fish family *Sparidae* has an oblong and laterally compressed body. They inhabit in saltwater environments and most of them are demersal, and found in shallow waters. Their eggs are pelagic and spherical (with a diameter of ~1 mm) with an unique central oil drop. Most sparids are hermaphroditic that are first males to transform later in females when reaching sexual maturity (protandric hermaphroditism) or the viceversa (protogynic hermaphroditism). Due to their excellent flesh, many representatives of this family have a high commercial value. Sparids include many genera and a large number of species (more than 100) that live in all tropical and temperate seas, including exceptionally cold and brackish waters. Only in the Mediterranean, there exist eleven genera: *Dentex*, *Sparus*,

# 1 GENERAL INTRODUCTION

---

*Diplodus*, *Pagellus*, *Pagrus*, *Lithognathus*, *Spondyliosoma*, *Oblada*, *Crenidens*, *Boops* and *Sarpa* (FAO, 2015).

## 1.1.3 Biology and morphological characteristics of the gilthead sea bream

The gilthead sea bream presents a laterally compressed body with an oval shape. The head profile is convex with small eyes. The cheeks are covered with scales, and the pre-opercula bone is scale less. The mouth has the mandible shorter than the maxilla. Both jaws show canine (4-6) and molar teeth, in 2-4 series in the upper jaw and 3-4 series, of which 1-2 are notably bigger, in the lower jaw. The gill rakes are short, 11-13 on the first gill arch and 7-8 on the lower part. The lateral line has 75-85 scales. The dorsal fin presents 11 hard and 13 soft rays, the anal fin 3 hard and 11-12 soft rays. The pectoral fins are long and pointed, while the ventral ones are short. The caudal fin has pointed lobes. All vertebrae present parapophyses and sessile ribs are absent (FAO, 2015).

The gilthead sea bream color is silver-grey with a big dark spot at the beginning of the lateral line that covers also the upper part of the opercula bone. A gold and black band is found between the eyes, the golden one always narrow in the central part. The dorsal fin is blue-grey with a median black line. The caudal fin is grey-greenish white with black tips (Figure 1-1).



**Figure 1-1.** Gilthead sea bream specimen.

## 1.1.4 Geographical distribution and habitat

Gilthead sea bream has a wide geographical distribution in the Mediterranean Sea and the Atlantic Ocean from Britain to Senegal coasts, although its presence is uncommon in the Black Sea (Lythago and Lythago, 1992; Moretti *et al.*, 1999).

Due to its euryhaline and eurythermal habits, this species inhabits in both marine and brackish water environments, such as coastal lagoons and estuarine areas, in particular during the initial stages of its life cycle. The spawn occurs in the open sea in October-December, and then juveniles migrate in early spring towards protected coastal waters, where they can find abundant trophic resources and milder temperatures.

Very sensitive to low temperatures (lower lethal limit is 4 °C), in late autumn they return to the open sea, where the adult fish breed. In the open sea, gilthead sea bream are usually found on rocky and seagrass (*Posidonia oceanica*) meadows, but it is also frequently caught on sandy grounds. Young fish remain in relatively shallow areas (up to 30 m), whereas adults can reach deeper waters, generally not more than 50 m.

## 1.1.5 Food and growth

Gilthead sea bream is mainly carnivorous. In the nature, this species is a predatory of mollusks (bivalves and gastropods), crustaceans and small fish. It is generally considered as a fast growing species, reaching 300 g in the second year and 600 g in the third year. Maximum size described is 70 cm with a weight of 5 Kg (Castelló, 1993).

## 1.1.6 Reproduction

Gilthead sea bream is a protandrous hermaphrodite species whose breeding season occurs when photoperiod become shorter in decreasing days, from October to December in the Western Mediterranean (Lumare and Villani, 1973; Suau and López, 1976; Arias, 1980) or slightly later, between November and February in the Eastern Mediterranean (Gordin and Zohar, 1978; Ben-Tuvia, 1979). Sexual maturity develops in males at 2 years of age (20-30 cm) and in females at 2-3 years (33-40 cm). Females are batch spawners that can lay 20,000-80,000 eggs every day for a period up to 4 months. In captivity, sex reversal is conditioned

# **1 GENERAL INTRODUCTION**

---

by social and hormonal factors. The eggs are planktonic, spherical and transparent, 1 mm in diameter and with a single oil drop (Cejas *et al.*, 1992; Moretti *et al.*, 1999).

## **1.1.7 History of culture**

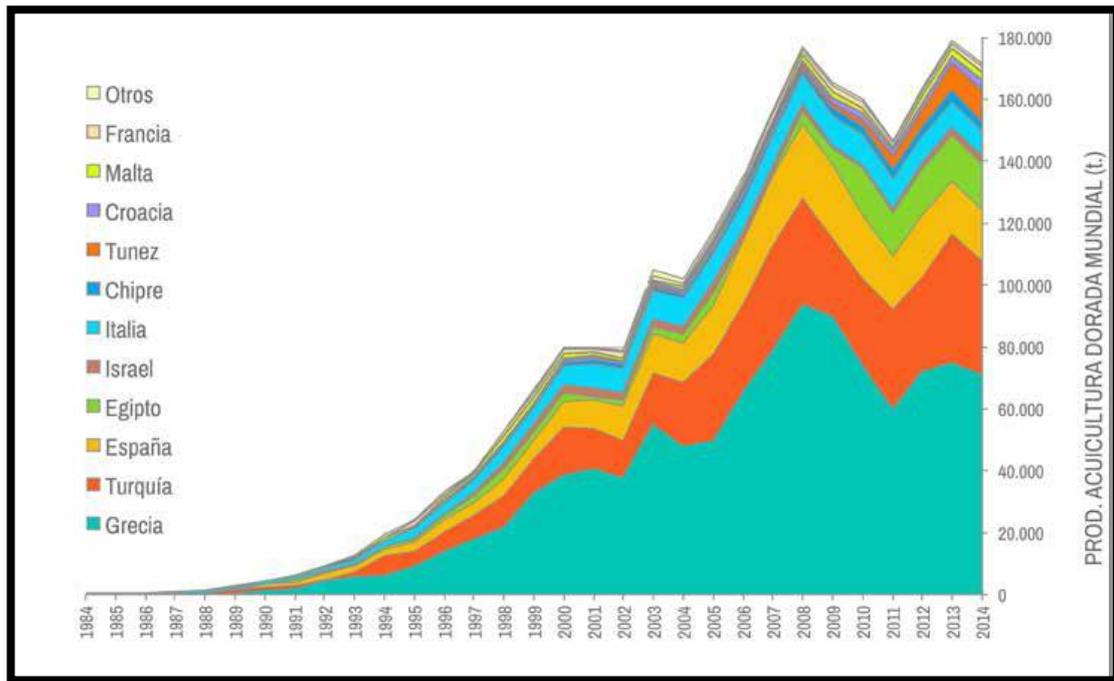
Traditionally, gilthead sea bream was cultured extensively in coastal lagoons and saltwater ponds, until intensive rearing systems were developed during the 1980s. The Italian 'vallicoltura' or the Egyptian 'hosha' are extensive fish rearing systems that act like natural fish traps, taking advantage of the natural tropic migration of juveniles from the sea into coastal lagoons. Gilthead sea bream is an excellent species to be produced under extensive aquaculture conditions in the Mediterranean basin due to its good market price, high survival rate and feeding habits (able to use different components of the food chain).

Artificial breeding was in Italy in 1981-82 and large-scale production of gilthead sea bream juveniles was in 1988-1989 in Spain, Italy and Greece. The hatchery production and farming of this fish is one of the success stories in the aquaculture business. This species, very quickly, demonstrated a high adaptability to intensive rearing conditions, in ponds and cages, and its annual production increased regularly until reaching 173,024 mT in 2014 (APROMAR, 2015).

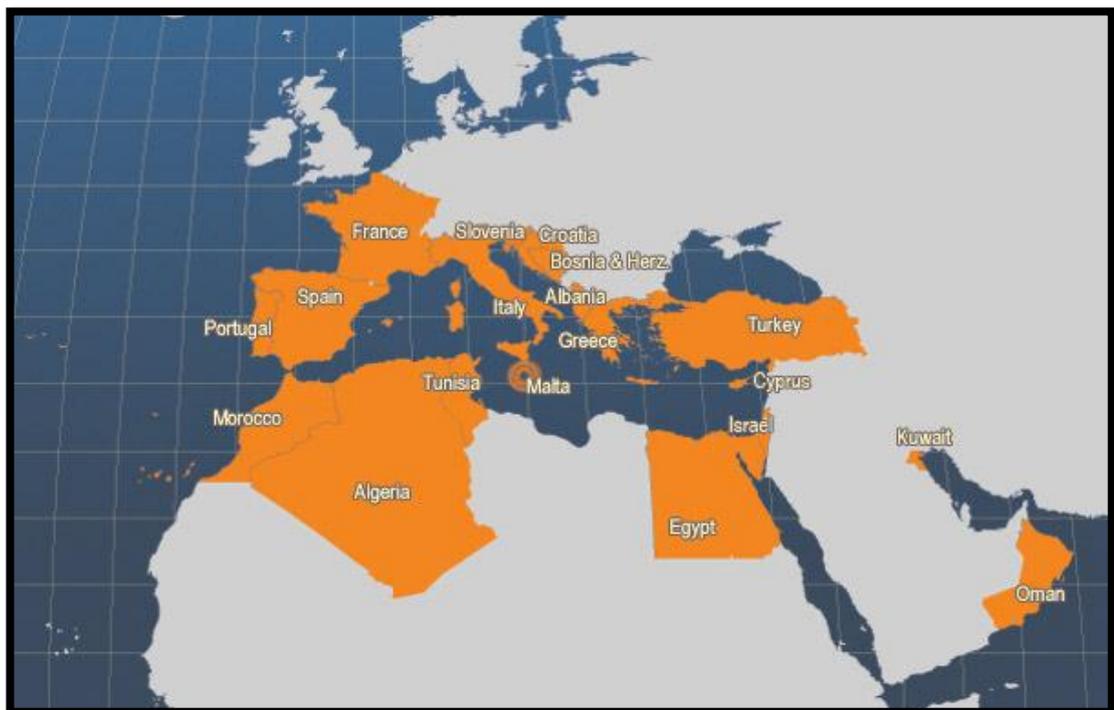
## **1.1.8 Current status of the culture**

Gilthead sea bream is the most important marine finfish species in Mediterranean aquaculture and its production is still on expansion. This species is produced in 20 countries, mainly in Greece, with 71,000 mT. (representing 41 % of total production), Turkey with 37,000 mT (21.4%) and Spain with 16,230 mT (9.4%). (Fig.1-2). Other countries that produced this species are Egypt, Tunisia, Italy, Cyprus, Croatia, Malta, Israel, France and Portugal, and there exist emerging productions in Albania, Algeria, United Arab Emirates and Bosnia. (APROMAR, 2015) (Fig.1-3).

# 1 GENERAL INTRODUCTION



**Figure 1-2.** Progression of gilthead sea bream aquaculture production in the Mediterranean area and in the rest of the World from 1984 to 2014 (APROMAR, 2015).

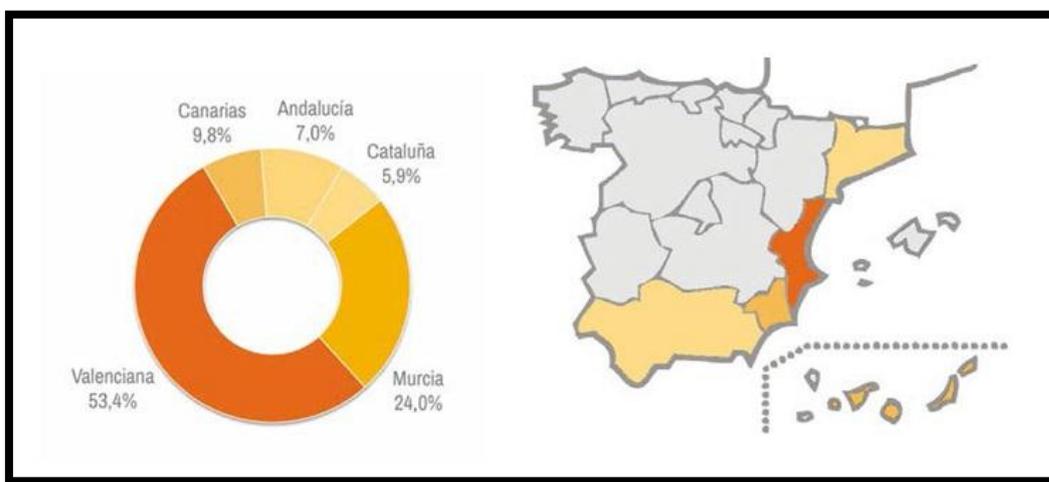


**Figure1-3.** Main producer countries of Gilthead Sea bream (FAO, 2015)

# 1 GENERAL INTRODUCTION

Commercial production of this species in Europe triggered in the late 1980s and the first 1990s, due to an increased availability of juveniles to be reared in ponds and cages (Shields, 2001; Cañavate and Fernández-Díaz, 2001), thanks to the heavy investment in applied research (data from FEAP, 2008).

Spain is one of the important producers of gilthead sea bream. In 2014, Valencia lead sea bream aquaculture production with 8,662 mT (53.4 % of the total), followed by Murcia (3,892 mT, 24%), Canary Islands (1,588 mT, 9.8 %), Andalusia (1,136 mT, 7%), and Catalonia (952 mT, 5.9%). Noteworthy, significant drop for almost half of the production occurred in the Canary Islands in the last decade (Fig.1-4).



**Figure1-4.** Distribution of the gilthead sea bream productions in Spain for Autonomous regions in 2014 (%) (APROMAR, 2015)

In other countries like Egypt, the aquaculture is currently the largest single source of fish supply accounting for almost 77 % of the total fish production of the country with over 98 % produced from privately owned farms. Most aquaculture activities are generally located in the Northern Nile Delta Region, with fish farms usually found clustered in the areas surrounding the four Delta Lakes. Recently, the majority of farmed fish are either freshwater species or those that can grow in brackish water. The production of fish and crustaceans in marine water is still in its early stages and its development is influenced by technical and economic problems. Gilthead sea bream is produced in limited amounts in marine fish farms. The total production of gilthead sea bream increased from 3,365 t in 2001 to 18,424 t in 2014 (GAFRD, 2016).

## 1.2 Genetic and its applications in aquaculture

Genetic improvement programs are an essential tool to increase the competitiveness of the industry. It has been estimated that the use of genetically improved broodstocks for productive traits can contribute to a 50 % reduction of production costs (Gjedrem *et al.*, 2012). The application of this research field in terrestrial animals and plants has made a substantial contribution to a sustain growth and viability of the agroindustry (Ponzoni *et al.*, 2007; Neira, 2010; Gjedrem *et al.*, 2012). However, compared to terrestrial farm animals, the application of the principles of quantitative genetics in fish has been limited and most of the fish species farmed in many countries, especially developing countries, are genetically similar or inferior to wild. Although in general, the response to selection is supposed to be higher in fish and shellfish than in terrestrial animals (Olesen *et al.*, 2003), improvement programs has progressed slower than expected (Neira, 2010; Rye *et al.*, 2010; Gjedrem *et al.*, 2012.). Less than 10% of aquaculture production is based on genetically-improved stocks (Gjedrem *et al.*, 2012). Although genetic strategies in aquaculture are not abundant, some genetic breeding programs have been developed for salmonids, carps, tilapia, catfish and sparids (Gjedrem, 1997; Gjedrem and Thodesen, 2005; Afonso *et al.*, 2012).

### 1.2.1 Selective breeding

Breeding programs improve fish quality and performance by selecting and mating only the best fish, in concordance with the idea that they transmit their superiority to their offspring. A selective breeding program is usually designed to improve productivity over several generations (a generation is the replacement of breeders by their offspring), and increase in this way the growth rates and yields gradually over many years (Ponzoni *et al.*, 2007, 2008). There are two main reasons to use successful selective breeding in aquaculture; a) aquaculture species have very high fecundity allowing a strong selection intensity; b) many traits of interest in aquaculture have a high heritability ( $h^2$ ), which means that selecting for these traits can deliver substantial genetic improvements through offspring generations (Gjedrem and Thodesen, 2005; Gjedrem *et al.*, 2012). Heritability is an essential concept for estimations of breeding values, genetic synthetic index and selection response (Falconer and Mackay, 1996). Thus, this parameter expresses how much phenotypic variation is explained by genetic additive variation, where environmental factors also play an important role in any breeding program depending on the trait and population. So, the

# 1 GENERAL INTRODUCTION

---

reduction, as much as possible, of environmental effects is important to discriminate genetic gain, superiority within the population, and reach reliable estimates of heritability and phenotypic and genotypic correlations under breeding programs (Gall and Huang, 1988).

Different selection approaches are possible. The "individual selection" refers to the selection based on the individual's phenotype with or without mating control (mass selection). This strategy is simple and inexpensive and commonly used in fish because it does not require strictly individual identification or the maintenance of pedigree records. Under this model, a cut-off value is established at a specific point so that all fish below this value are discarded, whilst those above that are retained. Individual selection is more effective in traits with high heritability, which imply high selection accuracy. For improving two or more traits, an effective approach has to be used, by using multi-trait synthetic index (Tave, 1995). However, fish breeding programs based on individual selection have a risk of inbreeding because a few parents produce large progenies.

Some experiments were unable to generate performance improvements using mass selection because of the lack of genetic variation within the starting population (Teichert-Coddington and Smitherman, 1988) or a large reduction in heritability in subsequent generations (Dunham and Brummett, 1999). Hulata *et al.* (1986) observed no improvement over two generations of mass selection for growth rate in Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*), due to inbreeding and genetic drift. An important factor with great effect on individual's phenotype and the efficiency of selection process is the environmental variance, which has to be minimized to ensure that genetically superior individuals are detected based solely on the measurement of their phenotype (Kirpichnikov, 1981). All these data indicate that simple and unstructured mass selection will result in problems unless the number of parents is large (Gjerde *et al.*, 1996; Villanueva *et al.*, 1996), and even so, chance could have a negative effect.

Other selection approaches, widely used in fish aquaculture, are based on family selection. These methodologies use between-family and within-family selection or a combination of both types. Between-family, selection depends on arrangement the families in a rank and the best families are retained to be propagated to the next generation. Either the whole family or a random subsample is kept for next generation. In the within-family selection, individuals are selected within family groups, resulting in each family contributing the best individuals from that group. The criterion of this type of selection is the

deviation of each individual from the mean of the family to which it belongs. Finally, a combination of both information sources, within and between, becomes a more robust method since the best fish from the best families are selected and, therefore, the greater selection intensity should result in a higher response in each generation (Gjerde and Rye, 1998). Family selection allows for the selection of traits with low heritabilities as well as for traits only measurable after death such as disease resistance and carcass characteristics (Bentsen, 1990). Selecting from families also counteracts much of the variation due to environment and thus makes it easier to identify genetic differences in the population (Herbinger and Newkirk, 1990). The use of family information offers greater selection accuracy, but requires the identification of pedigree structure to establish family average (Aleandri and Knibb, 1999). Hence, family-selection until development of molecular tools was based on the ability to separate the families, by rearing them separately or, if tagging was possible, to tag them as soon as possible to be communally reared (Wohlfarth and Moav, 1985).

## 1.2.2 Genetic markers

The development of DNA-based molecular markers had a revolutionary impact on animal genetics and, particularly, in aquaculture. With molecular markers, it was theoretically possible to observe and exploit genetic variation through the entire genome (Liu and Cordes, 2004). Their application has allowed for a rapid progress in aquaculture exploitation of genetic variability and inbreeding, parentage assignments, species and strain identification, the construction of high-resolution genetic linkage maps and identification of marker genetic *loci* associated with quantitative trait *loci* (QTL), and use them in selection programs (Marker Assisted Selection; MAS). Several types of molecular markers have been highly popular in aquaculture genetics (Liu and Cordes, 2004; Hashimoto *et al.*, 2009, 2010), such as allozyme (Wilson *et al.*, 1995) and mtDNA (Funkenstein *et al.*, 1990), Restriction Fragment Length polymorphism (RFLP) (Botstein *et al.*, 1980), Randomly Amplified Polymorphic DNA (RAPD) (Welsh and McClelland, 1990), Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP) (Vos *et al.*, 1995), microsatellite (Tautz and Renz, 1984), Single Nucleotide Polymorphism (SNP), and Expressed Sequence Tag (EST) markers. Particularly microsatellites have become the most popular markers for genetic breeding in aquaculture due to the low costs, reproducibility and speed for analysis (Magoulas, 1999).

# 1 GENERAL INTRODUCTION

---

## 1.2.3 Microsatellite markers

Microsatellites or Simple Sequence Repeat (SSR), are molecular markers composed of tandem repeated units of short sequences (1-6 nucleotides) that are abundantly distributed across the genomes (Tautz, 1989; Litt and Luty, 1989). Microsatellites are able to detect high levels of allele polymorphism (Chistiakov *et al.*, 2006). The alleles differ in length due to the variation in the number of repeats. Estimated mutation rates of microsatellites range between  $10^{-2}$  and  $10^{-6}$  per *locus* per generation (Ellegren, 2000). This high evolutionary rate is caused by the polymerase 'slippage' during DNA replication and unequal crossing over during recombination that lead to outcome differences in the number of repeats (Tautz, 1989). The most abundant microsatellites are dinucleotides (30–67%). Particularly, the  $(AC)_n$  motif is the most common repeat motif, 2.3-fold more abundant than  $(AT)_n$  in the vertebrate genome (Toth *et al.*, 2000). Microsatellites behavior as codominant markers with a simple mendelian inheritance. They are relatively small and can be easily amplified by PCR using primers, which are designed from their flanking highly conserved regions. The products of amplification are separated by size through electrophoresis to detect the alleles and the polymorphism of microsatellite.

In the field of fisheries and aquaculture, microsatellites are useful for studies of genetic variability and inbreeding, parentage assignment, differentiation of genetic stocks, genetic breeding programs, constructing dense linkage maps, QTL determination and marker-assisted breeding programs. Thus, a large number of microsatellite markers has been described in aquaculture fish species, including Atlantic salmon (Sletten *et al.*, 1997; Skaala *et al.*, 2004), catfish (Liu *et al.*, 1999; Liu *et al.*, 2001; Serapion *et al.*, 2004), tilapia (Lee and Kocher, 1998; Palti *et al.*, 2001; Carleton *et al.*, 2002; Cnaani *et al.*, 2002; Streelman and Kocher, 2002; Rowena *et al.*, 2004), common carp (Crooijmans *et al.*, 1997; Tanck *et al.*, 2001; Liang and Sun, 2003; Kohlmann *et al.*, 2003; Lal *et al.*, 2004; Sun and Liang, 2004; Yue *et al.*, 2004; Li *et al.*, 2007), chinook salmon (Williamson *et al.*, 2001, Naish and Park, 2002), rainbow trout (Rexroad *et al.*, 2001, 2002a, 2002b; Nathan *et al.*, 2007), and Senegalese sole (Funes *et al.*, 2004).

In sparid species, numerous microsatellite markers, with a high polymorphism, have been used in gilthead sea bream (Magoulas, 1999; Batargias *et al.*, 1999; Launey *et al.*, 2003; De Innocentiis *et al.*, 2004, 2005; Brown *et al.*, 2005, Oliva *et al.*, 2005; Senger *et al.*, 2006; Castro *et al.*, 2007; Navarro *et al.*, 2008; Porta *et al.*, 2010; Lee-Montero *et al.*, 2013;

Negrín-Báez *et al.*, 2015), red sea bream (Takagi *et al.*, 1997), snapper (Adcock *et al.*, 2000), black spot sea bream (Stockley *et al.*, 2000; Piñera *et al.*, 2006), red porgy (Navarro *et al.*, 2008), common pandora (Ramšak *et al.*, 2003), and red banded sea bream (Ponce *et al.*, 2006; Navarro *et al.*, 2008).

## 1.2.4 Multiplex polymerase chain reactions

In the modern selective breeding programs, microsatellites allow for the identification of the parents of high-performing progeny in communal rearing environments and, therefore, assist in the selection process (García de León *et al.*, 1998). The large number of microsatellites needed for many of these applications can often generate high costs due to materials and staff time. However, cost reduction can be achieved through multiplexing microsatellites processing. The multiplex PCR approach is based on the combination several primer sets amplifying different *loci* in the same PCR reaction, to be later processed simultaneously in a single lane of an electrophoretic gel or sequencer (Olsen *et al.*, 1996; Chamberlain *et al.*, 1988; Neff *et al.*, 2000). Multiplex PCR requires that primers lead to amplification of unique regions of DNA, both in individual pairs and in combinations of many primers, under a single set of reaction conditions. Data analysis should allow the analysis of each individual amplification from the mixture of all products (Markoulatos *et al.*, 2002).

For a successful multiplex PCR assay, the relative concentration of the primers, concentration of the PCR buffer, balance between the magnesium chloride (MgCl<sub>2</sub>) and deoxynucleotide (dNTPs) concentrations, cycling temperatures, and amounts of DNA template and Taq DNA polymerase are important. An optimal combination of annealing temperature and buffer concentration is essential in multiplex PCR to obtain highly specific amplification products. MgCl<sub>2</sub> concentration needs only to be proportional to the amount of dNTPs, while adjusting primer concentration for each target sequence is also essential (Markoulatos *et al.*, 2002).

One of the most important concepts in multiplex PCR is the optimal primer-to-template ratio. The optimization of multiplex PCR should aim to minimize such nonspecific interactions. Parameters such as homology of primers with their target sequences, length, GC content, and concentration has to be considered for the primer design and T<sub>m</sub> threshold (Brownie *et al.*, 1997). The final primer concentrations may vary considerably among *loci*

# 1 GENERAL INTRODUCTION

---

and need to be empirically established. When there is uneven amplification, primer ratios need to be changed increasing the concentration of primers with a “weak” signal and decreasing the concentration of the “strong” *loci* (Navarro *et al.*, 2008).

Multiplex PCR reactions are an optimized cost-effective rate and robust tool for genotyping (Neff *et al.*, 2000; Wesmajervi *et al.*, 2006; Navarro *et al.*, 2008). Renshaw *et al.* (2006) reported a lower material cost of multiplex reactions than single ones. These authors showed that sample genotyping on tetraplex or octaplex reactions were 3.5 and 6.7 times lower than individual genotyping, respectively. They also reported similar money saving values in staff time. Neff *et al.* (2000) required one-fourth the PCR consumables for genotyping four microsatellite markers with a tetraplex reaction than with single ones. Navarro *et al.* (2008) compared the staff, consumable and running costs of genotyping with ten microsatellite markers in a multiplex PCR *versus* separated PCR reactions demonstrating that multiplex reactions were no more than one-sixth that of single reactions even when these were performed in a unique run. On the other hand, multiplex reactions also minimize genotyping errors since they reduce steps during the sample analysis process and introduce automation. Bonin *et al.* (2004) analyzed twice eighteen microsatellite markers with single PCR on 34 samples of brown bear, and reported a 0.8% of genotyping errors due to human factors. Moreover, multiplex PCR reduces the risk of contamination and avoids the mix of genotypes from different samples (Navarro *et al.*, 2008).

However, in sparids, few multiplex reactions with a high number of microsatellites have been proposed. For common pandora, Ramšak *et al.* (2003) developed a multiplex PCR with three microsatellite markers by means of the touchdown technique. For gilthead sea bream, Launey *et al.* (2003) proposed two multiplex PCR reactions of three and five markers. Brown *et al.* (2005) developed the amplification of a multiplex PCR containing four microsatellite markers, whereas Porta *et al.* (2010) proposed two multiplex reactions of four and six markers as genotyping tools by combining microsatellite markers of identical annealing temperatures. Navarro *et al.* (2008), also in gilthead sea bream, developed two multiplex PCR reactions of ten and seven interspecific microsatellites markers. This multiplex assays also showed successful cross-amplification in red porgy (six markers in each multiplex) and in red banded sea bream (eight and five markers, respectively). Lee Montero *et al.* (2013) developed the first standardized panel of two new multiplex PCRs containing 11 markers each one, named SMsa1 and SMsa2 (Super Multiplex *Sparus*

*aurata*). Later, Negrín-Báez *et al.* (2015) established a set of 13 multiplex PCRs containing 106 specific microsatellite markers in total as a tool for QTL detection in gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.).

## 1.2.5 Relationship matrix and family contribution

Many fish species, including gilthead sea bream, allow for the establishment of viable individual crosses under a factorial design (Knibb *et al.*, 1998; Montero *et al.*, 2001), however its implementation within the context of the industry has significant problems due to facilities requirements and manpower efforts that trigger production costs. Under industrial conditions, this species is propagated through mass-spawning from broodstocks containing approximately 40 - 60 specimens. From a genetic point of view, this strategy shows the advantage that common environmental sources of variation are reduced, thus increasing the precision for genetic parameters estimation (Herbinger *et al.*, 1999). However, under this strategy, genealogy of offspring remains unknown, a factor absolutely necessary for the estimation of genetic parameters. Hence, this strategy requires physical tagging to identify all individuals in conjunction with DNA analysis to reconstruct pedigree information (Navarro *et al.*, 2008). Also, most mass-spawning models use spawns from only one or just a few days to build the fish population to be evaluated. Hence, there exists a tendency to reduce the effective number of breeders that contribute to next generation regarding effective size (Brown *et al.*, 2005; Fessehayé *et al.*, 2006; Piñera, 2009; Porta *et al.*, 2010). The matrix of relatedness between individuals is a key to estimate genetic parameters exactly those traits of economic interest for industry requirement (Navarro *et al.*, 2009a, b).

The representative of family contribution is a key element for genetic breeding programs, and particularly important in gilthead sea bream for a successful implementation of genetic improvement in the production system at hatchery level. The high fertility rate of gilthead sea bream can bias the offspring representation and batches of fishes from just a couple of breeders under mass-spawning can occur. It is a major disadvantage that can prevent the maximization of the response to selection. Hence, to monitor and maximize the contribution of the breeder score, under industrial mass-spawning conditions, is of a great practical importance for companies.

# 1 GENERAL INTRODUCTION

---

## 1.2.6 Genotype x environment interaction

The study of genotype-environment interaction (GxE) is a major issue in the final stage of breeding. These interactions may impose changes in the genotype rank order between environments and hence, change the absolute and relative magnitude of the genetic, environmental and phenotypic variances between environments (Bowman, 1972). Hence, the importance of this factor appears especially in fish species whose production systems are diverse (i.e. cages, ponds, indoors...) such as gilthead sea bream.

Gilthead sea bream is produced in different production systems with large environmental differences. In hatchery, fingerlings are produced under intensive or semi-intensive systems, whereas, in the on-growing stage, fish can be farmed in coastal ponds and lagoons, with extensive and semi-intensive methods, or in land-based installations and in sea cages, with intensive farming systems. These production systems and facilities of gilthead sea bream have effect on phenotypic values, especially on growth and fish quality traits. Thus, environmental differences can modify phenotypic values, interacting and producing GxE interaction (Falconer and Mackay, 1996). So, it is necessary to determine the GxE interactions in order to know the capacity of any industrial expansion with minimizing of genetic gain detrimental. GxE interactions can be estimated by animal's re-ranking in two different environments, establishing the genetic correlations of the same trait in the two environments and then considering them as different traits (Falconer and Mackay, 1996). Navarro *et al.* (2009a, b) estimated the GxE interaction in gilthead sea bream for growth traits through genetic correlations of the same traits in two environments (sea cages and tanks), observing weak re-rankings (with genetic correlations between 0.70 and 0.99), which were considered to be unimportant. Lee-Montero *et al.* (2015) estimated high values of genetic correlations in gilthead sea bream for growth and skeleton deformities traits at harvesting age in different environmental conditions (cages and ponds), with a scarce GxE interaction. Sae-Lim *et al.* (2013) showed that genetic correlations higher than 0.7 probably denote there not exist significant GxE interactions.

## 1.3 State of Selective breeding applications in aquaculture

During the last twenty years, aquaculture plays an important role in bridging the food gap to cover the needs of the human in terms of animal protein. Moreover, fish contribute

## 1 GENERAL INTRODUCTION

---

positively to human health, mainly due to the protective effect of fish lipid against cardiovascular diseases. In 2013, for first time, worldwide aquaculture production exceeded the fishing sector with 97.2 million mT, compared with 93.8 million mT from fisheries. Thus, more than 50% of aquatic products came from aquaculture (APROMAR, 2015).

As indicated above, modern breeding programs for aquaculture species have been established later than in plants and terrestrial animals. Thus, many fish and shellfish producers still use wild stocks or production stocks only a few generations removed from the wild (Tave, 1986). Although in general, the selection response is usually higher in fish and shellfish than animals farm (Olesen *et al.*, 2003), and the potential of genetic gain is well documented, the develop of improvement selection programs has slowly progressed (Neira, 2010; Rye *et al.*, 2010; Gjedrem *et al.*, 2012.). Actually, there is an increasing need for aquaculture companies to improve their competitiveness by optimizing their production and/or by increasing their products quality. In this regard, genetics is a tool of great potential, as it has been estimated that the use of genetically improved broodstocks batch to characterize productive traits, can contribute to a reduction of 50% of production costs (Gjedrem *et al.*, 2012). Although the genetic progress rate may seem small with respect to those attributable to the progress in management factors, it is continuous, cumulative and permanent (López-Fanjul and Toro, 2007). As it shown in Table 1-1, common carp, rainbow trout, Atlantic salmon, tilapia, channel catfish and ornamental fishes, are the species that received the most important genetic effort. However, there are other high-value species such as, European sea bass, gilthead sea bream and turbot, have been recently received some selective breeding applied programs (Chavanné *et al.*, 2016).

# 1 GENERAL INTRODUCTION

**Table 1-1.** Number of programs, number of families per program and average of number of traits selected in each program in different aquaculture species (modified from Neira, 2010, Rye *et al.*, 2010 and Gjedrem *et al.*, 2012).

Species	No. of programs	No. of families per program	Average n° of traits Selected
Common carp	8	76	2.0
Rohu carp	1	60-70	2
Silver barb	1	-	1
Tilapia Nile	20	299	3.6
Tilapia blue	2	90	2.0
Tilapia red	4	125	4.0
Tilapia O. shiranus	1	51	1.0
Channel catfish	1	200	4
African catfish	1	70	1
Striped catfish	1	182	3
Atlantic salmon	13	280	5.4
Chinook salmon	2	100	1.5
Coho salmon	4	133	207
Rainbow trout	13	206	5.2
European whitefish	1	70	2.0
Turbot	2	60	1.0
Atlantic cod	3	110	4.0
European seabass	3	100	5
Gilthead sea bream	4	100	6
Freshwater prawn	2	82	1
Shrimp, <i>P. monodon</i>	3	212	-
Shrimp, <i>P. vannamei</i>	4	197	2.0
Abalone	3	210	1.7
Oysters	3	48	4.3
Mussel	1	60	3.0

## 1.4 State of genetic improvement in gilthead sea bream

As in other species of aquaculture, the genetic improvement programs in gilthead sea bream are not common in the industry. Most research efforts were focused on the optimization of nutrition, reproduction or disease prevention. The reasons are partly due to the lack of specialized personnel, the high costs to organize production following genetic criteria, the biological characteristics of gilthead sea bream, and lack of methodologies that combine the principles of production with the exploitation of genetic variation. Although there are some enterprise-level breeding programs in this species (Rye *et al.*, 2010; Chavanné *et al.*, 2016; Janssen *et al.*, 2016), few genetic parameters that have been published, and even fewer have been estimated under industrial conditions.

Knibb *et al.* (1997) estimated a heritability of  $0.34 \pm 0.02$  for weight at harvest size using regression coefficients from replicate selection lines. Thorland *et al.* (2006), estimated heritability for slaughtering weight (250-400 g) ( $0.61 \pm 0.06$ ), the color of the skin assessed by a discrete scale ( $0.20 \pm 0.02$ ), and deformities (presence/absence) of head ( $0.05 \pm 0.02$ ) and spinal deformities ( $0.12 \pm 0.02$ ). Antonello *et al.* (2009) estimated genetic parameters for characters of growth (heritability of  $0.38 \pm 0.07$  for body length) and resistance to pasteurellosis gilthead sea bream (heritability from  $0.12 \pm 0.04$  to  $0.45 \pm 0.04$  for disease resistance). Navarro *et al.* (2009a, b) were the first authors that estimated heritabilities for a great number of traits (growth, carcass and body composition, carcass traits), under industrial conditions, and their phenotypic and genetic relationships. These authors found that heritability values ranged from 0.28 to 0.34 for weight, from 0.27 to 0.35 for length, from 0.05 to 0.13 for condition factor, 0.02 to 0.50 for body composition traits and from 0.12 to 0.31 for carcass traits. Lee-Montero *et al.* (2015) estimated, for first time in this species, the genetic parameters of skeletal deformities (from 0.07 to 0.26), and growth traits (from 0.20 to 0.41 for fork length, and from 0.17 to 0.43 for condition factor), at different commercially significant ages, considering the GxE interactions, which were scarce. These estimations of heritability are very encouraging and are of the same magnitude with other intensively cultured species such as Atlantic salmon (Standal and Gjerde, 1987), and rainbow trout (Mckay *et al.*, 1986).

All these data indicate that there exists a large potential for the improvement of some important traits such as weight-related traits through selective breeding in gilthead sea bream. In this species, breeding programs are currently between 1-5 rounds of genetic

# 1 GENERAL INTRODUCTION

---

selection. Estimations of genetic gain have been reported for Brown (2003), 29% on harvest weight, Navarro *et al.*(2009) and Lee-Montero *et al.* (2015) reported 19% for weight at slaughtering size, Knibb (2000), 5–10% in growth rate, and Thorland *et al.* (2015), 13% in harvest weight over 2.6 selected generations. Currently, only 31-44% of gilthead sea bream selected seed are on-grown at commercial level (Chavanne *et al.*, 2016).

## 1.5 Important economic traits in gilthead sea bream in genetic improvement programs

Within the target traits, for industrial exploitation, it is especially interesting in all those whose optimization leads to a more profitable economic production. Hence, any breeding program should define the goals or objective of improvement at beginning, to define the evaluation and monitor progress (Gjedrem, 2000).

Feeding costs in animal production, including fish, represent more than 65% of the total costs, so the feed conversion (FCR) trait is one of the most important economical traits, to be considered. However, due to the difficulty of measuring this trait in industrial conditions in fish (Kause *et al.*, 2006), their improvement is usually done indirectly through growth traits (weight, length and specific growth rates) (Gjedrem and Thodesen, 2005; Navarro *et al.*, 2009a, b), because it has a high and positive genetic correlation these traits (McPhee *et al.*, 1979; Afonso, 1996).

Performance and carcass characteristics are also very important economical traits since they are used for human consumption (Souza, 2008). The manufacture of processed products such as filleting represents a very interesting sector for industry and the consumer market. Although, these types of marketing untapped in gilthead sea bream, market surveys show that would be an interesting, profitable and high demand industry (Luna *et al.*, 2006). Therefore, it is important to use carcass traits as selection criteria related mainly to fillet yield (Silva *et al.*, 2009). In this regard, the morphometric measurements can be used to evaluate the carcass quality as a selection criterion in genetic improvement programs and to get correlated response on fish body component yield (Rutten *et al.*, 2004).

Nowadays, the consumer are interested in aspects related to flesh quality, such as flavor, juiciness, texture and appearance that in turn are associated with body composition (Navarro *et al.*, 2009b). Meat quality and body composition traits such as lipid content are

# 1 GENERAL INTRODUCTION

---

also very important traits, which have also potential as indicator traits of feed efficiency (Pym, 1990; Archer *et al.*, 1999). Fat content in the muscle is very important component, positively correlated with flavor and juiciness (Grigorakis, 2007).

Morphological appearance is another important economical trait that affects to the product marketing (Blonk *et al.*, 2010; Costa *et al.*, 2011). The importance of this trait is growing in animals products marketed as a whole like gilthead sea bream. Morphological traits in fish are also associated to other traits such as compactness and carcass traits. So, fillet weight is closely related with fillet length and height. To increase the efficiency of any selection program, these important traits should be measured in a clear and precise manner (without personal bias) and at a low cost (Gjedrem, 1997). In this sense, Navarro *et al.* (2016) developed a fast and automated software for image analysis (IMAFISH\_ML), to measure 27 fish morphometric traits (technological and non-invasive traits) on three commercially relevant fish species: gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.), meagre (*Argyrosomus regius*) and red porgy (*Pagrus pagrus*). These traits are related with growth, carcass and flesh composition traits, which are the most important traits in different genetic improvement programs in fish. There are some potential publications that estimated the genetic parameters for some morphological characteristics in fish. In rainbow trout, Gjerde and Gjedrem (1984) and Kause *et al.* (2003) showed that traits like body condition, body shape, skin colour and spottiness of large can be modified through selective breeding. This was indicated by their high heritabilities ( $h^2 = 0.46\text{--}0.61$  on the underlying liability scale and  $0.29\text{--}0.50$  on the observed scale). In Nile tilapia, Rutten *et al.* (2005) found that there was a strong relationship between body measurements and fillet weight. Kocour *et al.* (2007), estimated genetic parameters for growth and processing traits in the common carp, and found that standard length, body weight, percent fat and relative head length had a high heritability ( $> 0.5$ ), while relative body height, relative body width, percent processed body and fillet yields had a medium heritability ( $0.2\text{--}0.5$ ). Costa *et al.* (2010) estimated genetic and environmental effects on cultured European sea bass shape and found high heritabilities of axes scores ( $0.40\text{--}0.55$ ), and there was a good correlation between shape differences and geographic distances between broodstocks. In common solea (*Solea solea*), Blonk *et al.* (2010) compared, estimated genetic parameters of shape and body measurements, obtained with digital image analysis and manual measurements. This result showed that estimated genetic parameters were similar across methods. Heritability for shape using digital image analysis was  $0.34 \pm 0.11$ .

# 1 GENERAL INTRODUCTION

---

## 1-6 Justification and aims

Gilthead sea bream industry needs to improve its competitiveness to sustain a long-term activity. Although important advances have been achieved in nutrition, reproduction or disease control in the last years, breeding programs are still unexplored. This is due in part to the high cost of companies to organize their production with genetic criteria. Although the genetic progress rate could appear small in comparison with other management factors, this offers a complementary, continuous, cumulative and permanent way to improve the production values (López-Fanjul and Toro, 2007). Under industrial conditions, gilthead sea bream is propagated through a mass-spawning approach, requiring physical tagging devices to identify all individuals, in conjunction with DNA analysis, to reconstruct the genealogy (Navarro *et al.*, 2008). However, more information about the strategies to get a maxim representation of families, and how to manage the fish population for genetic evaluation, is necessary to get optimal estimates of genetic variation.

To maximize the genetic progress in any selective breeding program, there are various aspects that must be taken into account, (a) Minimum size of families, (b) Equal number of sexes in broodstock, and (c) Equal family contribution (Falconer y Mackay, 1996). The establishment of directed crosses with homogeneous family sizes requires extensive facilities, only practicable in large multinationals companies with large scale production. However, for small producers, it is not easy to face such costs, so they cannot compete unless they make highly specialized products. Thus, although the items listed above on the family contribution are true, a combination of low consanguinity and increased the number of family can offer an alternative for those companies that they cannot establish large-scale programs, it does allow their to implement genetic improvement programs. In a genetic selection program, the animals are ranked according their genetic breeding values, in a given trait, in a way that whose matings in mass-spawning produce minimal inbreeding. But what do about those breeders that are not mated, when they are "ideal" for producing new genotypes of greater genetic talent?. If it happens, the opportunity to get better genetic combinations per unit of time will decrease.

Before starting a breeding program, the improvement objectives (biological traits of commercial interest for companies), and selection criteria (traits through which is carried out) need to be defined (Gjedrem, 2000). Another essential aspect is how the traits are measured, because the standardization of measurement methods allows for comparisons

# 1 GENERAL INTRODUCTION

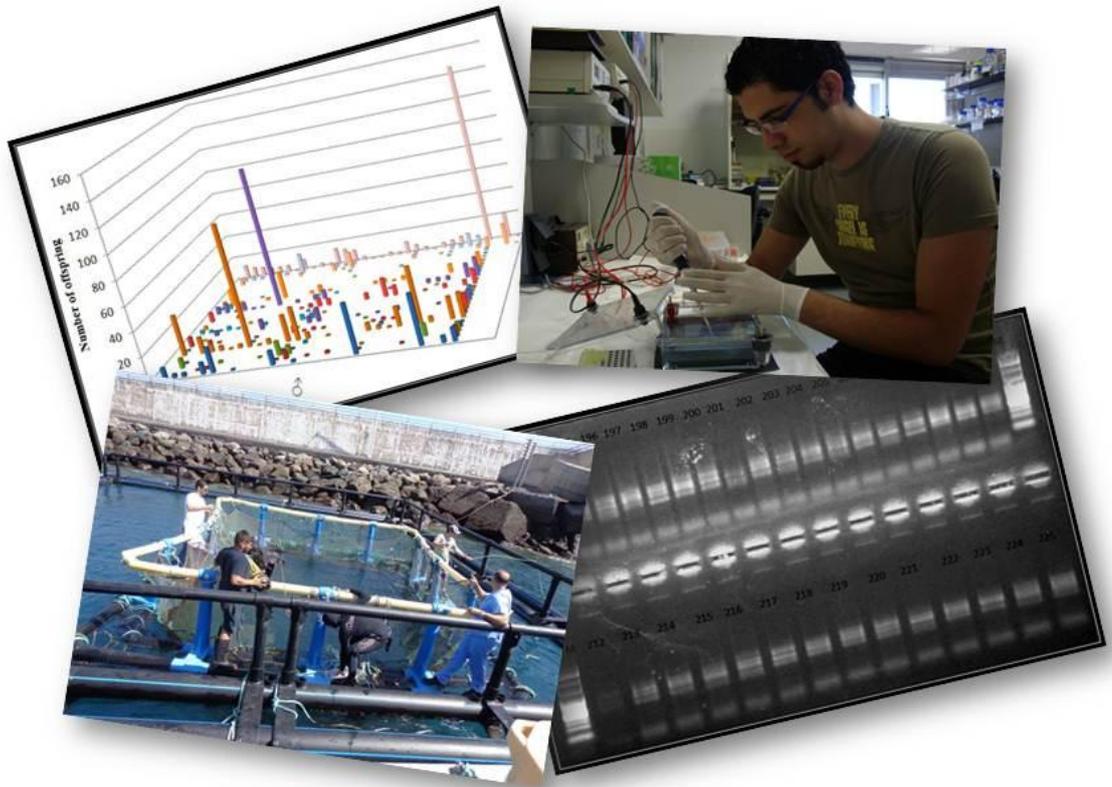
---

between and within companies and programs, and at the same time increases the accuracy of genetic parameters estimations (Afonso *et al.*, 2012). When breeding programs are developed, one of the most important aspects is the perfect definition of selection criteria, in an objective and precise manner (without personal bias), and at a low cost (Gjedrem, 1997). Since large data matrices obtained simultaneously in different locations, which makes differences between measuring methods, introduce sources of environmental variation and it is difficult to clean in some cases. All of this could lead to decrease the estimates of heritability and increased environmental variance. So one of the most important ways to maximize the estimates of heritability of a trait, and therefore genetic progress between generations, is the development of new technological tools and derivate traits, which, from the genetic point of view, are highly correlated with the important biological traits, interesting for the industry.

Given all this, the objectives of the current study are:

- 1- To optimize the factorial familiar structure by using consecutive mass-spawnings, under industrial conditions.
- 2- To study the existence of additive genetic variability of biological traits in the second generation of PROGENSA breeding program (named INNOTECCSS).
- 3- To study the existence of additive genetic variability of new non-invasive technological traits (Key Enabling Technologies; KET's).
- 4- To study the genetic correlations between biological and non-invasive technological traits, in order to identify new massive, numerous, precise and economical methodologies for genetic evaluations, at industrial scale.
- 5- To quantify the GxE interactions for biological and non-invasive technological traits, through the evaluation of descendants from the same families in different locations-culturing systems.





**2. OPTIMIZATION OF FACTORIAL FAMILIAR  
STRUCTURE IN GILTHEAD SEA BREEM (*SPARUS  
AURATA* L.) BY USING CONSECUTIVE MASS-  
SPAWNINGS, UNDER INDUSTRIAL CONDITIONS**



One of the most important aspects of the fish breeding programs success is the production of new recombinants per time unit between selected animals according their breeding values, which depend of familial contribution. Maximization of familial contribution, and minimization of the average coancestry between mates per generation, under Mass-spawning model, would allow increasing the genetic gain. In this study, three different spawnings in gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.) were implemented, according their number of spawning days; one (small scale 1DS, and large scale 1DL), two (2DL) and four (4DL) consecutive days under industrial conditions, in order to maximize the contribution under Mass-spawning production system, in terms of the number of families. All batches were cultured in industrial-like facilities with different numbers of breeders, sex ratio (male:female), and under similar culturing conditions. At sampling time, growth traits were estimated through body weight, fork length, condition factor and specific growth rate. Genotyping and parental assignment were inferred by using microsatellite markers in multiplexes PCR. In the 1DS model, composed for 18 breeders, a total of 17 spawned in the three batches (94%) to produce a total of 21 FS families and 16 HS families (maternal or paternal). At the 1DL model, with 66 breeders, only 28 fish (42 %), 17 females and 11 males, contributed to the spawning. A total 89 FS families were represented and 24 HS families (8 paternal and 16 maternal). In the 2DL model, 139 breeders (67%) contributed to the spawning and established 297 FS families and 105 HS families (52 paternal and 53 maternal). In the 4DL model, constituted for 123 breeders, 83 fish (67%), 40 females and 43 males, contributed to produce a total of 201 FS families, where 59 were HS families (32 paternal and 27 maternal). The percentages of contributed breeders at the second and third tested model (2DL and 4DL) were similar, and clearly higher than the first model. Regarding the total number of families per breeder, the 4DL model was the highest versus others tested models (1DL and 2DL). These data suggest that the use of consecutive Mass-spawning allows to combine the industrial culture model with obtaining a high number of families and number of sibs per family for genetic selection.

### **Keywords**

Gilthead sea bream, mass-spawning, factorial familiar structure, familial contribution.

## 2.2 INTRODUCTION

---

Gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.) is one of the most important species in Mediterranean aquaculture that reached a total world production of 173.024 metric tons in 2014 (APROMAR, 2015). This volume of production has been reached thanks to significant advances in different fields such as nutrition, reproduction, disease control and genetic improvement, even though not all these research fields have progressed at the same speed, and hence contributing unequally to the gilthead sea bream production business model.

In the last quinquennium, implementation of genetic improvement programs has drawn the attention of gilthead sea bream producers to maintain a sustained growth in a competitive way. Although the organization of the industrial production based on genetic criteria increases the production costs, and at the beginning shows low genetic progress rate in short term, the genetic improvements provide a tool for a continuous, cumulative and permanent growth in the industry (López-Fanjul and Toro, 2007). Most of these programs have been mainly established on two different approaches in order to generate enough families for a robust evaluation: i) *mass-spawning*, with random mating of breeders in communal tanks, and ii) *directed-crosses*, based on artificial fertilization with a manual controlled mating scheme. The main advantages of *mass-spawning* are the feasibility to be easily integrated in an industrial production routine, without demanding high investments in facilities and staff, the reduction of biases in genetic parameter estimations associated with common environment sources (Herbinger *et al.*, 1999), and the maximization of family crosses in a factorial familiar structure manner. On the contrary, *directed-crosses* maximize the familial control, but also the production costs since individual families have to be generated by stripping and later kept separately until tagging (3 - 15 g in weight), increasing the common environment sources. Thus, *mass-spawning* has become the most popular approach for family production pursued in public and private breeding programs in gilthead sea bream (Chavanne *et al.*, 2016), coupled to molecular tools for efficient parentage assignment and pedigree reconstruction for inbreeding control (Navarro *et al.*, 2008; Lee-Montero *et al.*, 2013).

An important issue for the success of fish breeding programs is the generation rate of new recombinants between selected animals according to their breeding values. In the gilthead sea bream industry, most of the hatcheries distribute their breeders in tanks, for *mass-spawning*, containing approximately 50 - 60 animals (sex ratio 1:1) that release eggs daily under controlled photoperiod conditions. Although these broodstocks are available to produce

## **2. OPTIMIZATION OF FACTORIAL FAMILIAR STRUCTURE IN GILTHEAD SEA BREAM**

---

from thousands to millions of eggs per day (normally referenced per kilogram of female along spawning season), most producers prefer those spawns with the best eggs quality and quantity evaluated by fertility, hatching and larval survival rates (Fernández-Palacios, 2005). Under this production model, is difficult to establish a precise estimation of families' representation and number of offspring per family, which really is a disadvantage of the *mass-spawning* approach, for evaluation of some traits like survival or disease resistance. Moreover, the high fertility rate of gilthead sea bream can also easily bias family production, becoming a major drawback of this approach for a proper evaluation of genetic merit. Brown *et al.* (2005), found a high variance in family sizes, with a large number of non-contributing fish to the offspring that reduced the effective population size (Falconer and Mackay, 1996). Astorga (2005), reported 88.8 % of variation coefficient for fertilized eggs per female and day, indicating a significant variation in daily eggs production between and within breeders. In other species, Frost *et al.* (2006) studied the genetic diversity loss in two independent commercial hatcheries of barramundi (*Lates calcarifer*) over three *mass-spawning* events finding that broodstock's contribution and effective population size in multiple spawns differ between daily egg batches. So, the success of breeding programs based on *mass-spawning* is strongly dependent on the way that breeders, under evaluation, are managed to maximize family production and deal with inbreeding (number of breeders and families, relatedness of breeders, etc...), in order to preserve genetic variation (Pante *et al.*, 2001; Aho *et al.*, 2006).

The selection of optimal breeders requires high genetic variation levels in the broodstocks to maintain stable responses over time (Falconer and Mackay, 1996). The maximization of genetic gain should be compatible with low inbreeding rates restricting crosses between related parents (Meuwissen, 1997; Grundy and Hill, 1993). Nirea *et al.* (2012), described that, under BLUP schemes, maximum genetic gain per generation and minimum rates of inbreeding in percentage are reached under a factorial familial structure when Minimum coancestry mating (Sonesson and Meuwissen, 2000) or Minimized covariance of ancestral contributions mating (Henryon *et al.*, 2009) are implemented. Moreover, Sonesson *et al.* (2012), reported that designed inbreeding rate in a breeding program can be reached when inbreeding control with estimation of breeding values are implemented under pedigree data. Thus, the maximization of familial contribution and minimization of the average coancestry between mates per generation would allow increase of selected seed into the market, actually estimated between 31-44% (Chavanne *et al.*, 2016), for gilthead sea bream. Hence, the main objective of this study was to analyze the familial

## **2.2 INTRODUCTION**

---

contribution of some broodstocks under different egg collection models in a *mass-spawning* approach. The information obtained is useful to assist in the generation of family crosses in the nuclei of breeders and harmonize the commercial interests of the industry to evaluate genetic merits during their production cycles.

## 2.3. MATERIALS AND METHODS

### 2.3.1 Biological material and traits

Three different spawning contribution models were considered in this study according to the number of consecutive days in which eggs were collected and pooled: one (1D), two (2DL) and four (4DL) days. All egg batches, were incubated under the same conditions and cultivated similarly as described in Roo *et al.* (2009). Samplings for growth traits were carried out according to AquaExcel-TOL (AquaExcel Project 2013) for body weight (ATOL:0000351), fork length (ATOL:0001658), condition factor (ATOL:0001653), and specific growth rate (ATOL:0001662).

#### *One-day spawning model (1D)*

In this model, two broodstocks with different number the specimens were evaluated: Small and Large. A Small broodstock, referred as 1DS, included six breeders (4 males: 2 females) into the same tank at the Marine Science and Technological Park of the University of Las Palmas de Gran Canaria (PCTM, Gran Canaria, Spain). Three different and independent broodstocks of 1DS were constituted (18 breeders in total). Each one produced a batch of eggs collected from only one day, and named as PCTM<sub>1DS-1</sub>, PCTM<sub>1DS-2</sub>, PCTM<sub>1DS-3</sub>. The Large broodstock (referred as 1DL), consisted in 66 breeders (sex ratio  $\cong 2\text{♂}:1\text{♀}$ ) into the same tank at Tinamenor S.A. Company (San Vicente de la Barquera, Cantabria, Spain), from where only one egg batch was evaluated. Batches of 1DS and 1DL were cultured at the PCTM facilities, under industrial production conditions. The three 1DS batches were sampled (45, 47 and 53 specimens for PCTM<sub>1DS-1</sub>, PCTM<sub>1DS-2</sub>, PCTM<sub>1DS-3</sub>, respectively) at 194 days post-hatching (dph), to estimate the breeders' contribution. For 1DL, 200,000 juveniles were sent to a cage located at Playa de Vargas 2001 S.L. Company (PLV2001<sub>1DL</sub>, Gran Canaria, Spain), and sampled at 130 dph. Also, a subsample of 479 specimens was retained to the on-growing facilities of PCTM (named as PCTM<sub>1DL</sub>) for on-growing, as described in Navarro *et al.* (2009). At 509 dph, fish from PCTM<sub>1DL</sub> and PLV2001<sub>1DL</sub> (479 and 395 specimens, respectively) were slaughtered, growth traits were quantified, and a piece of fin per fish was stored in ethanol until analysis.

#### *Two-days spawning model (2DL)*

This model corresponds to the experimental design explained in Lee Montero *et al.* (2015). Shortly, in this model, egg batches from two consecutive days were collected and

## **2. OPTIMIZATION OF FACTORIAL FAMILIAR STRUCTURE IN GILHEAD SEA BREAM**

---

pooled. Three broodstocks with different numbers of breeders and sex ratio were evaluated. They were distributed in three different Spanish institutions (one public university and two private companies): PCTM in the Canary Islands (PCTM<sub>2DL</sub>; n=59, 1.8♂:1♀), CULMASUR S.A. (CSUR<sub>2DL</sub>) in the South of Spain (n=99, 1♂:1♀), and PISCIMAR S.L. (PMAR<sub>2DL</sub>) in the East coast of Spain (n=48, 1♂:1.2♀). Pieces of fins from all breeders were stored in ethanol until their genetic analysis. The eggs collection and larval rearing were synchronized across facilities and a random sample of 1,400 animals was exchanged each other to constitute, from genetic point of view, homogeneous batches to be evaluated. At 179 dph, fingerlings were individually tagged by using Passive Integrated Transponder (PIT; Trovan Daimler-Benz) into the abdominal cavity, according to Navarro *et al.* (2006). The on-growing period was carried out under industrial conditions in cages located in the Canary Islands (PCTM<sub>2DL</sub>, CANEXMAR<sub>2DL</sub>), in ponds located in the South of Spain (PIMSA<sub>2DL</sub>), and in cages located in the Mediterranean coast (CULTIMAR<sub>2DL</sub> and Servicios Atuneros del Mediterráneo S.L.; SADM<sub>2DL</sub>). At marketing size, a total of 4,093 fish were harvest and evaluated for growth traits

### *Four-days spawning model (4DL)*

In this model, eggs from four consecutive days were obtained from broodstock at the PCTM (PCTM<sub>4DL</sub>, n= 65), and at the Instituto de Investigación y Formación Agraria y Pesquera (IFAPA) in the South of Spain (IFAPA<sub>4DL</sub>, n= 58). Both broodstocks were composed by selected breeders for growth and absence of morphological deformities among descendants of F1 produced by breeders from 2DL model. Pieces of fins from all breeders were stored in ethanol until their genetic analysis. Batches from both broodstocks were synchronized, incubated and reared under similar culturing conditions. Similarly, for 2DL model, a random sample of 1,400 fish from each research center was exchanged between them, and a sample was kept in each research center facility. Additional samples of fish were also sent to on-growing companies (ADSA<sub>4DL</sub> and PIMSA<sub>4DL</sub>). At harvest size, a total 1,944 fish were sampled for growth traits, and pieces of caudal fin were taken and conserved in ethanol for pedigree analysis.

### **2.3.2 Genotyping and parental assignment**

For parentage assignment, DNA was extracted from caudal fin, previously preserved in absolute ethanol, by using two methods. For 1DL model, the phenol-chlorophorm method

## 2.3. MATERIALS AND METHODS

---

(Sambrook *et al.* 1989) was used for DNA extractions, whereas for those from the 1DS, 2DL and 4DL was implemented the DNeasy kit (Nucleospin<sup>®</sup> 96 tissue, MACHEREY-NAGEL), by using TECAN robot Freedom Evo (Tecan Schweiz AG, Switzerland), and Freedom Evowar<sup>®</sup> *Standard* v2.5 software, following the manufacturer's instructions. DNA was stored at -20°C in the provided buffer until use. DNA quantity and quality were determined using a *NanoDrop 8000* spectrophotometer v.3.7 (Thermo Fisher Scientific). Breeders and offspring of different models were characterized genetically using two different microsatellite multiplexes, according with the moment that those had been developed and experiments done. Thus, samples from 1DL model were analyzed with RimA multiplex following the conditions described by Navarro *et al.* (2008); samples from 1DS, 2DL and 4DL models, were analyzed with SMsa-1 multiplex PCR (Super Multiplex *Sparus aurata*), developed by Lee-Montero *et al.* (2013), and following the conditions described for these authors. Genotypes were estimated by *GENEMAPPER* v.3.7 software and using the bin set kit, RimA-kit or SMsa1-kit created by Navarro *et al.* (2008) and Lee-Montero *et al.* (2013), respectively. Family relationships between breeders and offspring were determined by the exclusion method using *VITASSIGN* v8.2.1 software (Vandeputte *et al.*, 2006), where the breeders' gender was considered as unknown.

### 2.4.1 Phenotyping

All *mass-spawning* models of this study were evaluated in terms of the total number of breeders (tB), and breeders contributing to the offspring (cB). In all these models, offspring was reared until commercial slaughtering size except for 1DS, where fish were slaughtered at 194 dph. The phenotypic results for growth traits (body weight, fork length, condition factor and SGR) are shown in Table 2-1. For 1DS model, its three tested batches (PCTM<sub>1DS-1</sub>, PCTM<sub>1DS-2</sub>, and PCTM<sub>1DS-3</sub>) showed similar values for growth traits. In 1DL model, fish cultured at PLV2001<sub>1DL</sub> (oceanic-cage) showed higher growth values than those cultured at PCTM<sub>1DL</sub> (tank-facility), 33% and 9% for weight and length, respectively. In 2DL model, fish reared at PCTM<sub>2DL</sub> (tank-facilities) showed the highest values, and SADM<sub>2DL</sub> (oceanic-cage) the lowest ones, for all growth traits. In 4DL model, fish cultured at PCTM<sub>4DL</sub> and IFAPA<sub>4DL</sub> (tank-facilities), showed higher values for weight and length than those cultured at ADSA<sub>4DL</sub> (oceanic-cage) and PIMSA<sub>4DL</sub> (estuarine pond-facility). Fish from PIMSA<sub>4DL</sub> showed the lowest SGR value. High phenotypic correlations were observed between body weight and fork length with SGR values,  $0.81 \pm 0.06$  as average, within 1DS and 2-4DL weight classes. Correlations between weight and SGR ( $r_{1DS-Weight/SGR}=0.87$ ;  $r_{2-4DL-Weight/SGR}=0.66$ ) were lower than between length and SGR ( $r_{1DS-Length/SGR}=0.98$ ;  $r_{2-4DL-Length/SGR}=0.72$ ), independently of fish weight class. As expected, these correlations were higher, as average, in juveniles (0.92 in 1DS) than in adults (0.69 in 2-4DL). Accordingly, SGR comparisons between different weight classes (1DS, 1DL and 2-4DL) are not available. Within the same weight class (2DL and 4DL), SGR average was 18% higher in 4DL model than in 2DL model ( $0.72 \pm 0.04$  and  $0.61 \pm 0.04$ , respectively).

### 2.4.2 Genotyping and parental assignment

Parentage assignment for 1DS and 1DL offspring was 100 % to a single-parent pair. For 2DL model, 100% of single-parental assignment was obtained for PCTM and PMAR. For CSUR specimens, only 90% was assigned to single-parent pair and the 10% animals to two possible breeder couples. They were not excluded from the analysis and were considered as half-sibs families (maternal or paternal). For 4DL samples, the average percentage for single-parent pair assignment was 87.5 % for PCTM<sub>4DL</sub>, ADSA<sub>4DL</sub>, IFAPA<sub>4DL</sub> and PIMSA<sub>4DL</sub>. The remaining 12.5% descendants were assigned to two possible breeder couples and they were kept in the analysis as half-sib families (maternal or paternal). After checking the genotypes, all identified error corresponded to null alleles.

## 2. OPTIMIZATION OF FACTORIAL FAMILAR STRUCTURE IN GILTHEAD SEA BREAM

**Table 2-1.** Phenotypic results for body weight, fork length, condition factor and specific growth rate (SGR) (mean±standard deviation), and number of fish analyzed (N), for gilthead sea bream at harvest size in each facility (PCTM, Parque Científico Tecnológico Marino; IFAPA, Instituto de Investigación y Formación Agraria y Pesquera; PLV2001, Playa de Vargas 2001 S.L. Company; CANEXMAR, Canarias de Explotaciones Marinas S.L.; PIMSA, Pesquerías Isla Mayor S.A.; CULTMAR, Cultivos Marinos del Maresme S.A.; SADM, Servicios Atuneros del Mediterráneo S.L.). Three mass-spawning models were used: 1DS; one-day spawning, small scale. 1DL; one-day spawning, large scale. 2DL; two-days spawning, large scale. 4DL; four-days spawning, large scale.

Model	Batches	Body weight (g)	Fork length (cm)	Condition factor (g.cm <sup>-3</sup> )	SGR (%)	N
1DS	PCTM <sub>1DS-1</sub>	13.7 ± 0.1	9.4 ± 0.02	1.5 ± 0.01	0.82 ± 0.12	45
	PCTM <sub>1DS-2</sub>	12.1 ± 0.1	8.8 ± 0.02	1.7 ± 0.01	0.66 ± 0.12	47
	PCTM <sub>1DS-3</sub>	10.5 ± 0.1	8.5 ± 0.03	1.6 ± 0.01	0.66 ± 0.12	53
1DL <sup>A</sup>	PCTM <sub>1DL</sub>	365.4 ± 2.9	25.4 ± 1.3	2.2 ± 0.20	0.50 ± 0.001	479
	PLV2001 <sub>1DL</sub>	485.6 ± 4.0	27.7 ± 1.6	2.3 ± 0.10	*	395
2DL <sup>B</sup>	PCTM <sub>2DL</sub>	717.2 ± 4.6	31.4 ± 0.1	2.3 ± 0.01	0.76 ± 0.01	498
	CANEXMAR <sub>2DL</sub>	326.3 ± 5.2	24.4 ± 0.1	2.2 ± 0.01	0.57 ± 0.01	1132
	PIMSA <sub>2DL</sub>	352.7 ± 3.0	25.4 ± 0.1	2.1 ± 0.01	0.58 ± 0.01	953
	CULTIMAR <sub>2DL</sub>	321.7 ± 3.9	24.1 ± 0.1	2.3 ± 0.01	0.59 ± 0.01	655
	SADM <sub>2DL</sub>	231.6 ± 3.3	21.8 ± 0.1	2.2 ± 0.01	0.56 ± 0.01	855
4DL	PCTM <sub>4DL</sub>	473.3 ± 7.3	28.7 ± 0.1	2.0 ± 0.02	0.84 ± 0.01	369
	ADSA <sub>4DL</sub>	240.6 ± 2.6	22.4 ± 0.1	2.1 ± 0.01	0.69 ± 0.01	856
	IFAPA <sub>4DL</sub>	480.1 ± 5.9	28.3 ± 0.1	2.1 ± 0.01	0.70 ± 0.01	264
	PIMSA <sub>4DL</sub>	424.9 ± 3.5	26.4 ± 0.1	2.3 ± 0.01	0.65 ± 0.01	455

A, data from Navarro *et al.* (2009a,b). B, data from Lee-Montero *et al.* (2015).\*,Fish weighed only at the end of the experiment

### 2.4.3 Family contributions

The total numbers of breeders, breeders contributing to offspring in each batch and sex, and the number of full-sib (FS) and half- sib (HS) families, are shown in Table 2-2. For the 1DS model, in each batch or tank all breeders contributed to the offspring, except one breeder belonging to the PCTM<sub>1DS-3</sub>, i.e., a total of 17 breeders contributed in the three batches analyzed (94%), to produce an average of 7 FS families and 5.3 HS families per batch. In total, 21 FS families and 16 HS families (maternal or paternal; 76% of the total FS families) were constituted. For 1DL, only 28 fish (17 females and 11 males; 42%), out of 66 breeders, contributed to the offspring. A total of 89 FS families and 24 HS families (8 paternal and 16 maternal; 27% of the total FS families) were identified.

## 2.4 RESULTS

For 2DL, the total number of breeders contributing to the progeny was 139 (67 % of broodstock), 50 in PCTM<sub>2DL</sub> (85%), 78 in CSUR<sub>2DL</sub> (79%), and 11 in PMAR<sub>2DL</sub> (23%). The total numbers of FS and HS families were 297 and 105, respectively (52 paternal and 53 maternal, 35% of the total FS families).

For the 4DL model, 67% of breeders (40 females and 43 males; 78% at PCTM<sub>4DL</sub> and 55% at IFAPA<sub>4DL</sub>) contributed to produce a total of 201 FS families. The total number of HS families was 59 (32 paternal and 27 maternal, 29% of the total FS families).

**Table 2-2.** The total number of breeders (tB), number of contributors breeders (cB) to the spawning, in each batch and sex, and the number of Full-sib (FS) and Half- sib (HS) families. nd, not-determined.

Model			Total Breeders (tB)	Contributed Breeders (cB)	Full-sib families (FS)	Half-sib families (HS)
1DS	PCTM <sub>1DS-1</sub>	♂	4	4	-	4
		♀	2	2	-	2
		Sub-total	6	6	8	6
	PCTM <sub>1DS-2</sub>	♂	4	4	-	3
		♀	2	2	-	2
		Sub-total	6	6	7	5
	PCTM <sub>1DS-3</sub>	♂	4	3	-	3
		♀	2	2	-	2
		Sub-total	6	5	6	5
TOTAL			18	17	21	16
1DL	PCTM <sub>1DL</sub>	♂	nd	11	-	8
		♀	nd	17	-	16
		TOTAL	66	28	89	24
2DL	PCTM <sub>2DL</sub>	♂	38	31	-	16
		♀	21	19	-	18
		Sub-total	59	50	83	34
	CSUR <sub>2DL</sub>	♂	nd	39	-	31
		♀	nd	39	-	31
		Sub-total	99	78	193	62
	PMAR <sub>2DL</sub>	♂	21	6	-	5
		♀	27	5	-	4
		Sub-total	48	11	21	9
TOTAL			206	139	297	105
4DL	PCTM <sub>4DL</sub>	♂	nd	27	-	21
		♀	nd	24	-	17
		Sub-total	65	51	146	38
	IFAPA <sub>4DL</sub>	♂	nd	16	-	11
		♀	nd	16	-	10
Sub-total			58	32	55	21
TOTAL			123	83	201	59

## **2. OPTIMIZATION OF FACTORIAL FAMILIAR STRUCTURE IN GILTHEAD SEA BREEM**

The effective population size, the percentages of contributor breeders, number of family per breeder, number of sibs per family and the coefficient of variation, for the number offspring per family in each mass-spawning model, are shown in Table 2-3. As indicated above, there was a large variation in the contribution percentages for each broodstock, leading to a large variance in family number and family size. The percentages of breeders contributing offspring under the 2DL and 4DL were similar, and clearly higher than the 1DL model. However, the total number of families per breeder showed a positive correlation with the number of consecutive spawning days ( $r=0.95$ ), being 4DL model higher than other tested models, 2DL and 1DL, in 14% and 23%, respectively.

**Table 2-3.** Statistical data for breeders and family production for 1DL, 2DL and 4DL models. Estimate of Effective size, Percentages of breeders contributing to the offspring. Number of families per breeder, average offspring per FS and HS family, offspring per HS paternal (p) and maternal (m) and the Coefficient of Variation (CV) for the number offspring per family under each spawning model.

<b>Parameters</b>	<b>1DL</b>	<b>2DL</b>	<b>4DL</b>
Estimate of effective size <sup>c</sup>	106	157	155
% Breeders contributing to the offspring	42	67	67
N° families per breeder*	1.71	1.95	2.11
Average offspring per FS family	10.2	21.3	12.02 <sup>A</sup>
Average offspring per HS <sub>p</sub> family	11.3	19.2	8.90 <sup>B</sup>
Average offspring per HS <sub>m</sub> family	8.6	17.2	11.35 <sup>C</sup>
Average offspring per HS family	9.9	18.2	10.12 <sup>D</sup>
<b>Coefficient of variation of number offspring per FS family (%)</b>	<b>111.43</b>	<b>160.86</b>	<b>163.89</b>

<sup>(A, B, C, D)</sup>. 25, 19, 24 and 21, respectively, are estimated values if total descendants in 4DL model were equal to the 2DL model, considering the same family number. \*, it is the total of families established (FS and HS), corrected on number of total breeders. These averages were weighted per sample size. <sup>c</sup>, Effective size according Crow & Denniston (1988).

The family contributions under the 2DL (PCTM<sub>2DL</sub>, CSUR<sub>2DL</sub>) and 4DL (PCTM<sub>4DL</sub>, IFAPA<sub>4DL</sub>) models are shown in Figures 2-1, 2-2, 2-3 and 2-4, respectively. As shown, the number of families was higher in PCTM<sub>4DL</sub> than PCTM<sub>2DL</sub>, with a higher number of family contributions for males than females breeders. On the contrary, the number of contributions in CSUR<sub>2DL</sub> was higher than IFAPA<sub>4DL</sub>.

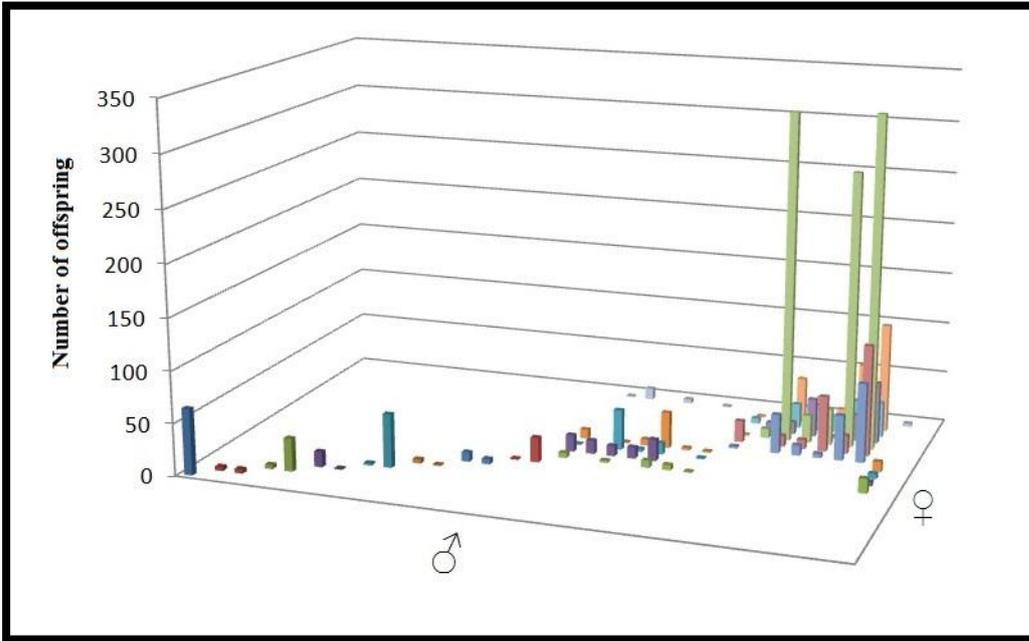


Figure 2-1. Family contributions under the 2DL model for PCTM<sub>2DL</sub>.

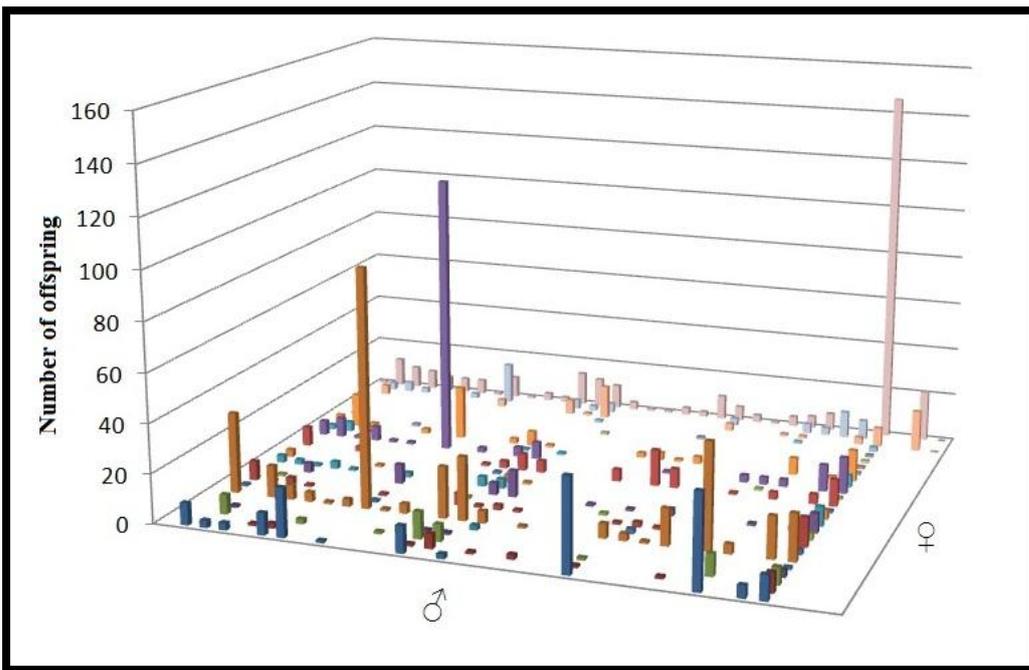


Figure 2-2. Family contributions under the 4DL model for PCTM<sub>4DL</sub>.

## 2. OPTIMIZATION OF FACTORIAL FAMILIAR STRUCTURE IN GILTHEAD SEA BREAM

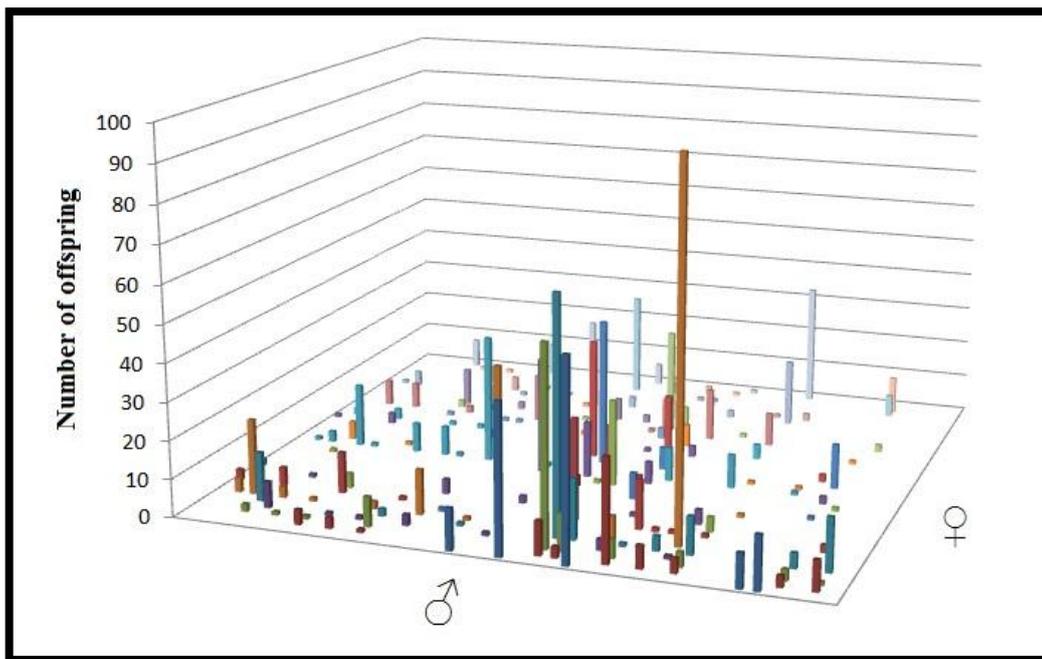


Figure 2-3. Family contributions under the 2DL model for CSUR<sub>2DL</sub>

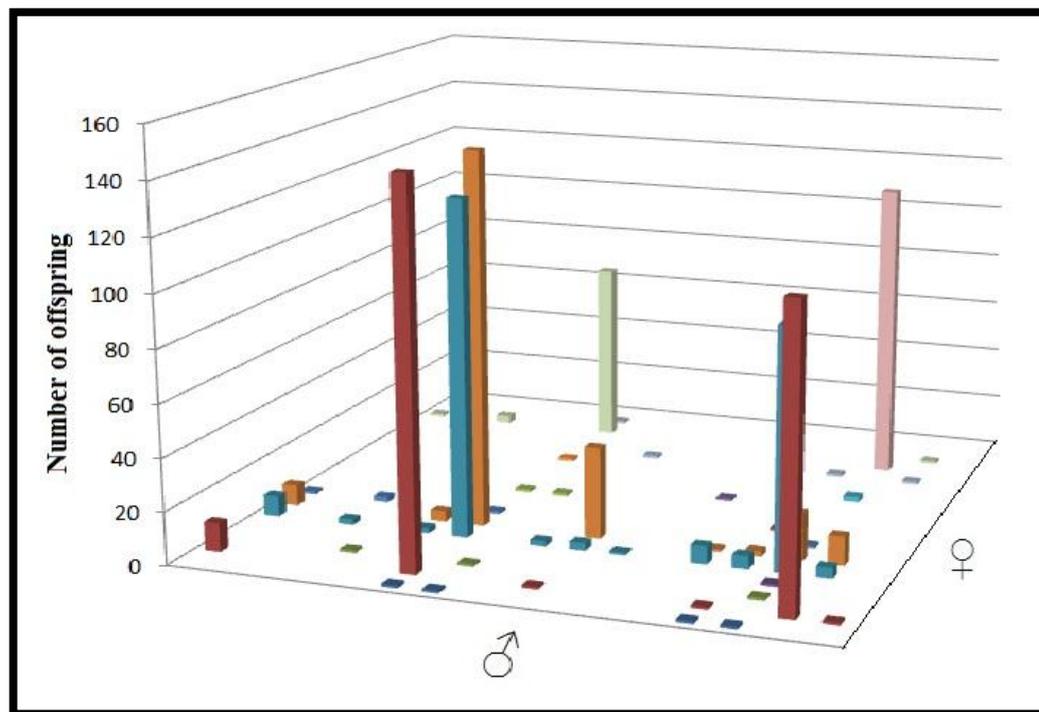


Figure 2-4. Family contributions under the 4DL model for IFAPA<sub>4DL</sub>

### 2.5.1 Phenotyping

In this study, new data for some growth traits in gilthead sea bream were obtained in different production systems including cages, ponds and tank facilities. All these animals were obtained under mass-spawning from small and large broodstocks after pooling egg batches constituted with different consecutive days (1DS, 1DL, 2DL and 4DL). Growth data provided in the 4DL model indicate that average weight at harvest was higher in tank-based (PCTM<sub>4DL</sub>, IFAPA<sub>4DL</sub>) than in ocean-cage (ADSA<sub>4DL</sub>) or estuarine pond (PIMSA<sub>4DL</sub>) facilities. These differences between tank (PCTM<sub>4DL</sub>) and cage (ADSA<sub>4DL</sub>) facilities in the Canary Island region can be explained at least partially by the type of feeding systems (self-feeder vs manual, respectively), temperature and density, which were similar to those described by Lee-Montero *et al.* (2015). Other important factor is the feeding frequency, which is clearly higher intense in culturing tank-based (PCTM<sub>4DL</sub>) than in ocean-cage (ADSA<sub>4DL</sub>), where, at the same time, bad weather plays an essential role during the feeding processes, decreasing the feeding periods. Similarly, the differences between tank (IFAPA<sub>4DL</sub>) and pond (PIMSA<sub>4DL</sub>) facilities in South of Spain can be explained by rearing conditions (5- 10 m<sup>3</sup> and 2,000 m<sup>3</sup>tanks, respectively), water quality (filtered pumped and estuarine water, respectively), and physico-chemical characteristics (small and high fluctuations in salinity or temperature conditions for IFAPA and PIMSA, respectively). Moreover, in the estuary is quite more difficult to adjust the amounts of feed to the existing biomass. Despite these growth differences, these results are in concordance with previously reported at the same Spanish regions (Ginés *et al.*, 2004; Navarro *et al.*, 2009; García-Celdrán *et al.*, 2015a; Lee-Montero *et al.*, 2015).

Concerning SGR, relevant significantly differences between specimens grown under 4DL over 2DL models were observed. Animals from the 4DL and 2DL models belong to the same public Spanish breeding program, PROGNSA<sup>®</sup> (Afonso *et al.*, 2012), in which selection pressure on growth traits and absence of body deformities (García-Celdrán *et al.*, 2015a; Lee-Montero *et al.*, 2015) were done. The 2DL and 4DL descendant samples belong to two consecutive generations of selection, (F1 and F2, respectively). Similar genetic progress for SGR have been obtained in other commercial breeding programs in gilthead sea bream such as in CULMAREX (Fernandes *et al.*, 2010), NIREUS (Thorland *et al.*, 2015) and ANDROMEDA (Kostas Tzokas, personal communication).

### **2.5.2 Mass-spawning and parental assignment**

The on-growing companies demand progressively a constant supply of high-quality fingerlings during whole year, in order to be produced under different production systems. To attend this demand, most of the hatcheries synchronize reproduction and design larval production using a mass-spawning approach, the most extended reproduction system in gilthead sea bream production sector (Chavanne *et al.*, 2016). Most of broodstocks are composed by 50-60 breeders per tank, with a sex ratio 1:1 or 1:2 (females:males), and synchronized by artificial photoperiod. Under this breeding structure, the number and weight of breeders play an essential role for overcoming some drawbacks at early larval stages such fertilization and larval mortality rates or deformities prevalence (Fernández-Palacios, 2005). Thus, mass-spawning lets to the hatcheries an economical balance between cost and profit, and it represents a design that minimizes environment effects on phenotypic and genetic parameters estimations (Herbinger *et al.*, 1999). However, the high number of eggs per kilogram of female during gilthead sea bream spawning season (Cejas *et al.*, 1992), the unknown of breeders' sex, and the factorial familial structure, do difficult to know the relationships between descendants and breeders. Accuracy of parental assignments and high number of families are especially important when breeders are under a genetic selection program, and genetic evaluation, in terms of cost minimization, maximum genetic gain and minimum rate of inbreeding per generation. In this study the SMsa-1 multiplex of microsatellite was used (Lee-Montero *et al.*, 2013), confirming its high efficiency to reconstruct parental assignments with a success of 87.5 - 100% in an unambiguous way at least a single-parent pair (100% of success for at least on single parent), under different scenarios of mass-spawning (small and large spawns from one, two or four consecutive days). It was available on fish coming from four consecutives spawns (4DL), spite of it represented a 8% of more families than those coming from two consecutives spawns (2DL; Lee-Montero *et al.*, 2015), and 23% of more families than only one spawn (1DL; Navarro *et al.*, 2009a,b). Success of 85% to 100% in parental assignments have also reported by using multiplex reaction of microsatellites on commercial species (Fishback *et al.*, 2002; Saillant *et al.*, 2006, 2007; Dupont-Nivet *et al.*, 2008). For spawns from four consecutive days with a 95.8% of unambiguously assigned offspring (Batargias *et al.*, 2015), or by using single reactions in gilthead sea bream (Castro *et al.*, 2008; Fernandes *et al.*, 2010), but at higher costs.

### 2.5.3 Family contributions

There are two critical aspects for genetic breeding programs: the number and size of families. Under a mass-spawning approach, the breeders contributing to descendants and the number of sibs are fully at random, prone to bias the family representation. In this study, the best results in terms of breeders contribution and family representation were reported by 1DS model (97%), which used the lowest number of breeders (six per broodstocks PCTM<sub>1DS-1</sub>, PCTM<sub>1DS-2</sub> and PCTM<sub>1DS-3</sub>). In all broodstocks, all females were mated with all males under mass-spawning (a perfect factorial familial structure), except in PCTM<sub>1DS-3</sub> broodstock, where only one male (M4) did not mate with both females. At small scale is much easier the interaction among all breeders than at larger scale, due to management factors that can modify fish interactions and behavior into the tanks including aspects of dominance (Knight, 1985). These results are agree with Sonesson and Nielsen (2012), who estimated that rate of inbreeding decreased and genetic gain increased, as expected, with increasing number of contributing sires and dams. In mass-spawning models at large-scale, the total number of families produced (corrected by the total number of breeders) is positively correlated with the number of consecutive days of pooled batched eggs. Thus, the 2DL model was clearly better than 1DL, while 4DL presented the best behavior in terms of total number of families. Concerning the number of offspring per type of family (FS and HS), values increased from 1DL to 2DL. For 4DL model, it appeared to decrease, but if these values are corrected, according the number of descendants sampled in 2DL, they would be higher (Table 2-3). Comparison between PCTM<sub>2DL</sub> and PCTM<sub>4DL</sub>, showed clearly a higher number of breeders contributing to the descendant, when the number of consecutive days increased (Fig. 2-1 and 2-2). This tendency was not corroborated by CSUR<sub>2DL</sub> and IFAPA<sub>4DL</sub> facilities. However, should be considered that CSUR<sub>2DL</sub> had 71% more of breeders. Due to both sceneries (PCTM<sub>2DL</sub> - PCTM<sub>4DL</sub> and CSUR<sub>2DL</sub> - IFAPA<sub>4DL</sub>), the final average of percentage of breeders contributing to the offspring were similar between 2DL and 4DL models, probably because during 2 or 4 days the breeders under sexual activity are the same. In any case, it seems that a high number of breeders and of consecutives mass-spawnings, at the same time, could increase the number of breeders contributing of descendants with positive impacts on genetic gain (Sonesson and Nielsen, 2012). However, from a practical point of view, most of hatcheries tend to constitute broodstocks without a very high number of breeders to avoid risks associated to accidental deaths, and eggs production program through all year. Hence, our data demonstrate that factorial familial structure can be improved through the number of

## **2. OPTIMIZATION OF FACTORIAL FAMILIAR STRUCTURE IN GILTHEAD SEA BREAM**

---

spawning days while maintain the number of descendants per family, which affects positively to the offspring relationships, genetic gain, and inbreeding rate, avoiding genetic variability loss.

Genetic variability is an important attribute of the species under domestication process or commercial exploitation. Thus, those with higher levels of variation are most likely to present high additive genetic variance for productive traits (Alarcón *et al.*, 2004). To preserve genetic variation as such as possible, there are different ways like maintaining several broodstocks and increasing the breeder's mating. Both aspects are closely related with the inbreeding rate, which has to be established previously in each generation. However, this prediction can be range widely or shortly respect to the observed one depending as breeders mated, and constituted and managed broodstocks. In the gilthead sea bream industry, it is easily solved, according its production system. Large gilthead sea bream hatcheries maintains a wide number of breeders under spawn, organized by different broodstocks, in order to response market demand along the year (around nine – ten broodstocks of 55 breeders each one, as average, i.e., around 500 breeders). Thus, spite broodstocks are subjected to different photoperiod regimes to maintain a continue fingerling production along the year, hatcheries with breeding programs in running can mix adequately the selected breeders genetics by mating, taking advantage of gilthead sea bream males mature at two years old and females at three years old (Ginés *et al.*, 2003). The results of this study, carried out under framework of INNOTECCS project (name of the second generation of PROGENSEA<sup>®</sup>), are in concordance with this last scheme. It, supports the idea that a genetic breeding program is also possible between small gilthead sea bream hatcheries when they coordinate and share information (phenotypic and genetic), about their hundreds of breeders structured in broodstocks (Afonso *et al.*, 2012). When hundreds of breeders are selected, from thousands of selected fish candidates previously evaluated, inbreeding rate and genetic gain can be maximized (Sonesson *et al.*, 2012).

Inbreeding rate can also be traced by effective population size ( $N_e$ ), mainly when genealogical matrix is not available, like in mass-selection (Falconer and Mackay, 1996). To use large effective population sizes is important, in order to design a breeding program (Aho *et al.*, 2006). The optimal effective population size to maintain genetic diversity may be in the order of several hundred. Meuwissen and Woolliams (1994) suggested that a  $N_e$  between 31 and 250, for preventing a decline in fitness traits. Tave (1993) recommends a  $N_e$  of 45-250 for food fish farming. Over the medium term, a constant  $N_e$  of 100 is the most applicable to

## 2.5 DISCUSSION

---

fish farming operations that are likely to be constrained in the size of facilities available for maintaining broodstock. A  $N_e$  of this magnitude should prevent substantial inbreeding and loss of alleles over a period of approximately ten generations (Tave, 1993). The results of this study were in concordance with the expected effective population size per generation, higher than one hundred for lots 2DL and 4DL (two consecutive generations of PROGNSA breeding program). Both estimations are agreed with Gjerde *et al.* (1983) and Jørstad & Nævdal (1996), who concluded that  $N_e$  of 100 per generation is sufficient to minimize inbreeding in salmonid breeding programs.

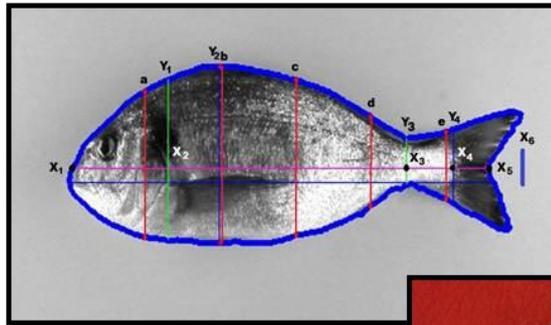
Methods to increase the effective population sizes are needed, in order to manage the genetic variation within the farm populations studied (Brown *et al.*, 2005). Many techniques, such as the manual stripping of fish and pair mating is an ideal scenario, but also difficult to implement in gilthead sea bream, because of the need of a critical number of fish to stimulate natural spawning behavior (Gorshkov *et al.*, 1997). Spite of it, this species allows the establishment of viable individual crossings (Knibb *et al.*, 1998; Montero *et al.*, 2001). However, its implementation within the context of the industry has presented problems because it increases production costs in terms of human resources and infrastructure (extensive facilities). However, mass-spawning is widely extended in the gilthead sea bream, because it optimized costs. In this study, mass-spawning based, the number of breeders contributing is increased from consecutive batches, and thus a greater  $N_e$ . Moreover, an alternative strategy to improve it, at industrial scale, could be use consecutive 4DL mass-spawnings with at least one month of difference, where supposedly different groups of breeders would be under sexual activity, without any effect on spawning quality parameters (Fernández-Palacios, 2005). Some opportunities exist, for example maximizing the number of fish spawning within a group by synchronizing the ovulation in females through the application of hormone treatments (Zohar and Mylonas, 2001). Batargias (1998) calculated the  $N_e$  of an experimental stock of gilthead sea bream over two successive seasons, based on the variance of parental contribution. The census size of the population was 32, and estimated  $N_e$  was 12.0 and 9.1m, from mass-spawning in two consecutive seasons. The low  $N_e$  observed in the offspring population was attributed to the high variation in the contribution of individual fish, an unbalanced sex ratio (especially in the second season) and no participation of several fish. Brown *et al.* (2005) found that the effective population size, based on sampling from a single mass-spawning, was moderately low, given the number of fish actually contributing and the number of fish in the broodstock as a whole. García-Celdrán *et*

## **2. OPTIMIZATION OF FACTORIAL FAMILIAR STRUCTURE IN GILTHEAD SEA BREAM**

---

*al.* (2016), reported similar results on three independent broodstocks of gilthead sea bream, belonging to the original broodstocks to establish the base population of PROGNSA Spanish breeding program in later generations, where differences in breeders contributing and unbalanced sex ratio affected to expected inbreeding rate, estimated from estimated population sizes. However, when genealogy data matrix under mass-spawning is known, and it is combined with optimized parent selection from BLUP evaluation with minimum inbreeding mating, is possible to manage inbreeding over generations within small breeding programs with 30-40 males and 30-40 females (Hely *et al.*, 2013). Moreover, inbreeding control is possible in selection breeding programs, i.e. desired and observed rates of inbreeding can be very similar when the same basis are used for pedigree control and breeding values estimations, i.e. pedigree-based inbreeding control with traditional pedigree-based BLUP estimated breeding values (Sonesson *et al.*, 2012).





**3. ESTIMATES OF GENETIC PARAMETERS FOR  
NEW NONINVASIVE TECHNOLOGICAL TRAITS,  
THEIR RELATIONSHIPS WITH ESSENTIAL  
BIOLOGICAL TRAITS AND GXE INTERACTIONS IN  
OCEANIC CAGES AND ESTUARIES ON GILTHEAD  
SEA BREAM (*SPARUS AURATA* L.)**



Gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.) is one of the most important species in the Mediterranean aquaculture. In the last quinquennium, implementation of genetic improvement programs has drawn the attention of gilthead sea bream producers to maintain a sustained growth in a competitive way. In order to study the existence of additive genetic variability, between biological traits and their estimated counterparts by engineering technologies or technological traits, and studying their genetic correlations with other traits such as growth, performance and carcass, and flesh quality, progenies obtained from the selected bloodstocks in two research centers (PCTM – ULPGC; Canary Island, and IFAPA; Andalusia), belonging to the second generation of the genetic improvement program PROGENSA® (named INNOTECCS), were tagged by Passive Integrated Transponder (PIT), and mixed at the two research centers and two Spanish companies (ADSA; Canary Island and PIMSA; Andalusia). At harvest size, fish were sampled for growth, carcass, flesh quality and technological traits, these last by IMAFISH software. Pieces of caudal fin were taken and conserved in ethanol for pedigree analysis. Genotyping and parental assignment were inferred by genetic characterization of all breeders and offspring, by using the SMsa-1 multiplex PCR (Super Multiplex *Sparus aurata*), containing 11 specific microsatellite markers. Genetic parameters (heritability and genetic and phenotypic correlations) for growth, performance, meat quality and morphology traits were estimated. Genotype–environment interactions (GxE), at harvest size, were estimated by genetic correlation between two facilities (ADSA and PIMSA).

Heritability estimates ranged from 0.09 to 0.25 for growth traits, from 0.04 to 0.35 for carcass traits, from 0.08 to 0.27 for body composition traits, and the highest were reported by technological traits from 0.04 to 0.40. The genetic correlations for growth traits were mainly medium and high, for carcass traits were medium, and for body composition traits they were negative and high for moisture versus lipids, negative and low for proteins vs. moisture and lipids, and for the technological traits were high. Genetic correlations between carcass and growth traits, the estimations were medium and high, except for dressing (%) versus length which was low. Between body composition traits and growth traits were generally low-medium except with moisture, which were medium and negative. For technological traits, all genetic correlations were medium-high with growth traits. For carcass traits, they were high and low for fillet weight and dressing%, respectively, with all technological traits. For body composition, were mainly medium between proteins or lipids versus technological traits, and medium and negative for moisture. Genetic correlations between technological traits with

## **3.1 ABSTRACT**

---

fillet weight and dressing %, were in general medium and low, respectively. For technological and carcass traits, were mainly low, and between technological traits and body composition, were positives with proteins or lipids, and low and negative with moisture.

Genetic-Environment interactions for all traits, at harvest size, were measured considering two culturing system (Cage in Canary island and estuary in Andalusia). They were mainly medium-high for all traits (between 0.46 and 1.00), except for FHA and FHB, which were low (0.05 and 0.16, respectively).

These data suggest that the new non-invasive technological traits (Key Enabling Technologies; KET's), present better additive genetic variation than biological traits, and higher precision, proposing new tools that can be used in breeding programs for gilthead sea bream, and that could lead a faster selection response to improve growth and morphology of the fish, through increased accuracy of breeding values and selection response rates.

### **Keywords**

Heritability, Genetic correlation, Quality traits, Flesh composition traits, non-invasive technological traits, Gilthead sea bream, *Sparus auratus*

## 3.2 INTRODUCTION

---

Gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.) is the most important marine finfish species in Mediterranean aquaculture and its production is still expanding worldwide. Total aquaculture production reached the 173,024 metric tons in 2014 (APROMAR, 2015) in a total of 20 countries, mostly located in the Mediterranean basin. In spite of this production, genetically improved seed production only accounts for 31-44% of total fries in the market (Chavanne *et al.*, 2016). Hence, advances in breeding program are essential to contribute to the profit and competitiveness of the companies, and at the same time to protect natural populations from uncontrolled escapes and competition processes.

Genetic improvement is an essential strategy that should be imbricated in the animal production systems. In almost all of terrestrial livestock animals, the genetic gain rate per year is estimated to be around 1 – 3% (López-Fánjul and Toro, 2007). In aquaculture, although genetic strategies are not abundant, a total of 101 breeding programs have been successfully reported in different species of freshwater and seawater, including fish, crustaceans and mollusks (Neira, 2010; Rye *et al.*, 2010). In general, freshwater species support 5.5-fold more breeding programs than seawater counterparts with a higher number of families (67%) in the selection schemes, as average. Nevertheless, the number of traits considered under selection is similar for both groups of species, mainly three traits: growth, morphology and resistance disease. For the five major species cultured in Europe (Atlantic salmon, rainbow trout, European sea bass, gilthead sea bream, and turbot), Janssen *et al.* (2016) reported that all breeding programs currently running in Europe consider different targeted traits (as selection objectives), related with growth performance, morphology, disease resistance, product quality, processing yield, reproduction and feed efficiency. As selection criteria (trait through which the selection is carried out), the size at harvest is the most and widely trait used to improve growth performance, with selection response values of 12%, 7-13%, 20-25%, 10-15% and 10-15% per generation, and cumulative genetic gain of +200%, +900%, +50-150%, <100% and +65% in Atlantic salmon, rainbow trout, European sea bass, gilthead sea bream and turbot, respectively (Janssen *et al.*, 2016)). Other traits on selection are more exploited in one species or other; thus, morphology traits are more relevant in sea bass and gilthead sea bream, while disease resistance are more important in rainbow trout, Atlantic salmon and Turbot (Janseen *et al.* 2016). Chavanne *et al.* (2016) updated the information of breeding programs in Europe for the same species, but also including common carp. These authors confirmed these results, except that also for common carp and rainbow trout programs reported the morphology as second trait on selection in importance.

Before starting a breeding program, selection objectives and selection criteria should be clearly established (Gjedrem, 2000). The criteria considered and the variables measured greatly affect the genetic progress through existing differences in additive genetic variation, in the population under selection, which is essential for breeding value prediction and selection response (Falconer and Mackay, 1996). A second and relevant aspect is that robust breeding program should test the same families under different culturing environments, becoming even more important the normalization of measurement methodologies for a trait to avoid uncontrolled variation sources (Afonso *et al.*, 2012).

#### **Selection traits**

Quantitative genetics is a powerful tool to improve animals performance as a whole. It has been estimated that the use of genetically improved broodstocks batches for traits of productive interest reduces 50% of production costs (Gjedrem *et al.*, 2012). Heritabilities and genetic and phenotypic correlations between different traits are key indicators in the success of breeding programs. Feeding costs in animal production systems, including fish, representing more than 65% of the total cost, so the feed conversion (FCR) trait is one of the most important selection objectives in genetic selection schemes. However, due to the difficulty for measuring this trait under industrial conditions (Kause *et al.*, 2006), this traits is usually indirectly improved through growth traits like weight, length and specific growth rate (SGR) as selection criteria (Gjedrem and Thodesen, 2005; Navarro *et al.*, 2009a). Feed conversion has a high and positive genetic correlation with these three traits (McPhee *et al.*, 1979; Kinghorn, 1983; Afonso, 1996; Kause *et al.*, 2006). Selection for these traits has brought relevant and positive consequences for the industry, and currently 100%, 93-95%, 44-52%, 34-43% and 31-44% of fish seeds grown in Europe are genetically improved for different traits, but mainly for growth, in turbot, Atlantic salmon, rainbow trout, sea bass and gilthead sea bream, respectively (Chavanne *et al.*, 2016).

Carcasses traits are also of high economic importance since they are closely related with the final price of the product because determine the fish percentage able to be ingested by the consumer (Souza, 2008). The manufacture of processed products such as filleting represents a good alternative to whole-piece markers demanded by the consumers. Although this type of marketing is still undeveloped in gilthead sea bream, market surveys show that would be an interesting, profitable and high demand industry (Luna *et al.*, 2006). However, important differences exist in fillet yield between and within species (Oliva, 2007; Navarro *et*

## 3.2 INTRODUCTION

---

*al.*, 2009b; Soula, 2012; García-Celdrán *et al.*, 2015a), probably due to the fish morphology, the experience of staff and methodology implemented for measuring (Rutten *et al.*, 2005). So, carcass traits can be used as selection criteria related to processing yield (Silva *et al.*, 2009), mainly in species which are marketed as derivate products or fillet, like Atlantic salmon and rainbow trout, where they are considered as the second or third trait in importance for selection breeding programs in Europe (Janssen *et al.*, 2016).

Nowadays, consumers are interested in aspects related to flesh quality, such as flavor, juiciness, texture and appearance that are significantly associated with body composition (Navarro *et al.*, 2009b). Meat quality and body composition traits, such as lipid content, are also very important traits, which have potential as indicator traits for selective improvement of feed efficiency (Pym, 1990; Archer *et al.*, 1999). Fat content in the muscle is very important component, and it is positively correlated with flavor and juiciness (Grigorakis, 2007). The percentage of fat is inversely proportional to the percentage of moisture, while the higher the fat contents the higher the juiciness (Grigorakis, 2007).

Morphology is an essential trait in fish, but especially in marine species because they are marketed as whole fish. Thus, irreversible modifications of morphology produce alterations (deformed fish) respect to a quality standard (Afonso and Roo, 2007). Many deformities have been described in fish (Astorga, 2005; Boglione *et al.*, 2013), where skeletal malformations are the most important. They are not accepted for hatcheries, on-growing companies and consumers because deformities decrease growth performance as well as the final price in the market due to an undesirable aspect (Ignacio De la Rosa, personal communication). Thus, during the fish commercialization processes between hatcheries and on-growing companies, these last do not accept lots with prevalence in fish deformities higher 5% (Afonso and Roo, 2007), establishing monitoring samplings (Enrique Haro, personal communication).

Despite the importance of these traits (growth, carcass, meat and fish quality), and the presence of some of indicators on their potentials for selective programs, few genetic parameters that have been published in gilthead sea bream for these economically important traits, and even fewer have been estimated under experimental and industrial conditions. For growth traits, heritability ranges between medium and high values, reveling its high potential for genetic improvement of gilthead sea bream populations, which is in concordance with high heterozygosity in artificial and wild populations (Oliva, 2007). Under experimental

### **3. ESTIMATES OF GENETIC PARAMETERS FOR NEW NONINVASIVE TECHNOLOGICAL TRAITS**

---

conditions, Knibb *et al.* (1997), based on the response to a divergent mass selection after a generation, estimated high (0.51) and intermediate (0.29) realized heritability values for weight at harvest size, in low and high selection lines, respectively. In industrial lots, Navarro *et al.* (2009a), reported also intermediate heritability values (0.28-0.34) at different relevant ages in days post-hatching (130 days, tagging size; 165 days, transferring to cage size; 330 days, first incipient or unfunctional sexual maturation; 509 days, harvest size), with genetic correlations ranging between low-high (0.11-0.93). Fernandes *et al.* (2010), estimated higher heritability values for weight at two sizes (0.43 and 0.45, at 345 and 496 days age, respectively), and weight gain between both ones (0.41), under only one culture system and region. In the framework of PROGNSA breeding program, medium heritability values have been estimated for weight at harvest size, 0.25 (García-Celdrán *et al.*, 2015a) and 0.29 (Lee-Montero *et al.*, 2015), and specific growth rate along on-growing period, 0.20 (Lee-Montero *et al.*, 2015), across environmental sceneries (four Spanish regions and cages and estuaries). However, when estimations were carried out in the same region-culturing systems, cages in Canary Islands where fixed factors are well controlled, estimates for weight are also high, 0.43 (Lee-Montero, 2012). For stress resistance, Montero *et al.* (2001) reported a low heritability for plasma cortisol after confinement, 0.06, and no selection response after selection, as expected. The second trait in importance for gilthead sea bream industry is the morphology (Chavanne *et al.*, 2016; Janssen *et al.*, 2016), because it is sold as whole fish. Astorga *et al.* (2004) estimated for first time for this species a high heritability (>0.70) for occurring of any deformity (38 classes). It was not observed by Castro *et al.* (2008), when lordosis and operculum deformations were separately determined, in spite of using the same methodology, which can be explained because these authors sieved deformed fish. Recently, García-Celdrán *et al.* (2015c) and Lee-Montero *et al.* (2015) described low-medium heritabilities for deformities in head, operculum and spinal column. Thorland *et al.* (2015) reported a low heritability of 0.16 for jaw deformity in an industrial population. For resistance disease, Antonello *et al.* (2009) estimated a low heritability of 0.12 for resistance to *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*, which requires complex and well focused approaches. Similarly, for body composition (carcass and flesh quality), at industrial scale, low-medium heritability values have been reported by Navarro *et al.* (2009b) and García-Celdrán *et al.* (2015a,b). So, improve traits with low heritability or difficult for measuring, other indirect selection methods, like genome selection, are available (Pérez-Enciso and Toro, 2007).

### Measurement methods

When breeding programs are carried out, one of the most important aspects is an appropriate definition of selection criteria to quantify and measure variables in a precise manner (without personal bias), and at a low cost (Gjedrem, 1997). Since large data matrices are usually built through simultaneously samplings in different locations, where uncontrolled sources of environmental variation occur, which are difficult to clean in some cases. This leads to a significant reduction of heritability estimates and an increasing of environmental variances. This reveals the importance of searching a way of standardization of measurement methods in breeding genetic, in order to let data comparisons between and within facilities through some generations. A relevant effort has been done in the AQUAEXCEL European project, to standardize measurement methods for 62 traits related with animal welfare, growth and meat, nutrition and reproduction and hosted in the AQUAEXCEL-ATOL. This database has been built following the criteria of 255 researchers, by establishment of definition, measurement method, material (biological, reagent and instrumental), units and value ranges, parameters to measure, synonyms and references (AquaExcel project, 2013).

One of the most important ways to normalize measurement methodologies for a target trait is the automatic analysis based on non-invasive technological traits, which has been demonstrated to increase the accuracy of heritability estimates for a trait and, hence, the genetic progress between generations. Known as technological traits, they are an engineering-mediated data acquisition in easy, friendly and scalable way. From genetic point of view, it is essential that these new technological traits are highly correlated with biological traits of commercial interest. Nowadays, there are some examples of traits that can be estimated using some technological ways. The percentage of lipids in the muscle can be estimated by using the device Distell Fish Fat Meter - FFM (Distell.com, West Lothian, Escocia), a non-invasive method that uses a microstrip sensor sensitive to the water content of the sample able to determine the percentage of fat in muscle. Afonso *et al.* (2012) studied muscle fat content in gilthead sea bream at harvest, in a population belonging to the PROGNSA breeding program, by direct (chemical) and indirect (FFM) measurement methods, on the same pieces of meat. These authors found a heritability 25% higher in FFM than in the former with a genetic correlation of 94%. Muscle chemical composition, can be also estimated by Infrared Spectroscopy (NIR), by using the FOODSCAN LAB equipment (FOSS, Denmark). For fat content, exists a phenotypic correlation of 0.96 between chemical and FOODSCAN for the same group of samples (Rafael Ginés, personal communication).

### **3. ESTIMATES OF GENETIC PARAMETERS FOR NEW NONINVASIVE TECHNOLOGICAL TRAITS**

---

Morphological traits are very important economic traits that affect product sales particularly when they are marketed as a whole piece like gilthead sea bream (Blonk *et al.*, 2010; Costa *et al.*, 2011). Chavanne *et al.* (2016) and Janssen *et al.* (2016) reported that morphology is the second most frequently selected trait gilthead sea bream, sea bass and common carp in Europe. In this sense, Navarro *et al.* (2016) developed fast and automated software for image analysis (named IMAFISH\_ML) to measure 27 fish morphometric traits (technological traits) on three commercially relevant fish species: gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.), meagre (*Argyrosomus regius*,) and red porgy (*Pagrus pagrus*). There are some potential publications that estimated the genetic parameters for some morphological characteristics in fish, such as rainbow trout (Kause *et al.*, 2003), Nile tilapia (Rutten *et al.*, 2005), common carp (Kocour *et al.*, 2007), sea bass (Costa *et al.*, 2010) and common sole (*Solea solea*) (Blonk *et al.*, 2010). Lee-Montero (2012) did a deep study about heritability of different deformities in gilthead sea bream, under selection process, and their genetic relationships with noninvasive technological traits, reporting genetic determination for some of them, defined by Navarro *et al.* (2016): Fish Maximum Height (FMH), Total Dorsal Area (TDA), Maximum Width (MW), Fillet Area (FilA), Fillet Volume (FilV), Tail-Excluded Length (TaEL), and Head Height (HeH). These traits presented medium-high (0.35 – 0.51) heritability estimates, and low-high genetic correlations with presence-absence of deformities, and high estimations with growth and carcass traits. However, their genetic relationships with body composition and genotype-environment interactions among them are known, when would be recommendable to do indirect selection through traits with higher heritabilities. In this regard, the morphometric measurements can be used to evaluate the carcass quality, in genetic improvement programs, and to get correlated response on fish body component yield (Rutten *et al.*, 2004).

The main objective of the current study is to determine the additive genetic variability for biological traits (growth, carcass and body composition) and new noninvasive technological traits, and compare those with their counterpart values obtained using, when adequate, by engineering technologies. The estimation of genetic correlations among some traits such as growth, carcass and flesh quality traits, by using a non-invasive manner, would let faster, more accurate and cheaper economic evaluations in breeding programs, reducing, on the other hand, animal suffering and minimizing the number of animals needed to obtain robust information for evaluations.

### 3.3.1 Biological material

In this study, genetic parameters of the second generation of PROGENSA breeding program (Afonso *et al.*, 2012), named and executed as INNOTECCS (Spanish national project, Ref.: RTA2013-00023-C02), were estimated.

**F0 (starting generation):** It was built by commercial and research broodstocks, with different numbers of breeders and sex ratio: Marine Science and Technological Park of the University of Las Palmas de Gran Canaria (PCTM, Gran Canaria, Spain) in the Canary Islands (n=59, 1.81♂:1♀), CULMASUR S.A. (CSUR) in Andalusia (n=99, 1♂:1♀), and PISCIMAR S.L. (PMAR) in Valencia (n=48, 1♂:1.23♀). To produce the first generation, all stocks were synchronized for eggs releasing and collection for two consecutive days. The eggs were simultaneously incubated at the facilities of aquaculture research centers, from three Spanish regions: PCTM in the Canary Islands, Instituto de Investigación y Formación Agraria y Pesquera (IFAPA) in Andalusia, and Institut de Recerca i Tecnologia Agroalimentàries, (IRTA) in Catalonia.

**F1 (first generation):** Larvae were reared in the conditions described by Roo *et al.* (2009). At 84 days post-hatching (dph), a random sample of 1,400 fish was exchanged between research centers, including a new center from another region: Instituto Murciano de Investigación y Desarrollo Agrario y Alimentario (IMIDA) in Murcia. At day 179 dph, fingerlings were individually tagged with a passive integrated transponder (PIT; Trovan Daimler-Benz), in abdominal cavity, following the tagging protocol described by Navarro *et al.* (2006). At the same time, a piece of caudal fin was taken and conserved in ethanol until DNA was extracted for genetic analysis, and reconstruction of genealogy. A sample of fish remained in the on-growing facilities at each research center as potential pre-elite broodstocks (the second generation), and the remaining fish were transported to the growth-out facilities: CANEXMAR S.L. (CANEXMAR; Canary Islands), PIM S.A. (PIMSA; Andalusia), CULTIMAR S.A. (Catalonia), and Servicios Atuneros del Mediterraneo S.L. (SADM; Murcia). At marketing size, 3,743 fish were slaughtered and analyzed for growth, yield, and meat and fish quality traits. The reconstruction of the relationships among the descendants and breeders was carried out following the indications described by Lee-Montero *et al.* (2013).

**F2 (second generation):** From the surviving F1 pre-elite broodstocks in PCTM and IFAPA, two elite broodstocks of breeders were built, one per each research center, to produce the second generation of fish composed of families with the higher breeding index that comprise length and the absence of body malformation after BLUP evaluation. Two control broodstocks were randomly selected, one per each research center. The number of breeders and sex ratio were similar in both elite (PCTM, n= 65 , 1♂:1.43♀, IFAPA , n=58, 1♂:1.42♀), and control (PCTM, n = 67 , 1♂: 1♀; IFAPA , n= 60, 1♂:1.4♀) broodstocks. As indicated above, these broodstocks were synchronized for egg releasing and embryos collected from four consecutive days, which were incubated at the same time, and cultured similarly as described in the F1 generation. Similarly, a random sample of fish was remained in the on-growing facility at each research center, as potential pre-elite broodstocks to constitute the third generation, and the remaining were transported to the collaborating fish farms in each region (ADSA; Canary Islands and PIM S.A. in Andalusia).

#### **3.3.2 Analyzed traits**

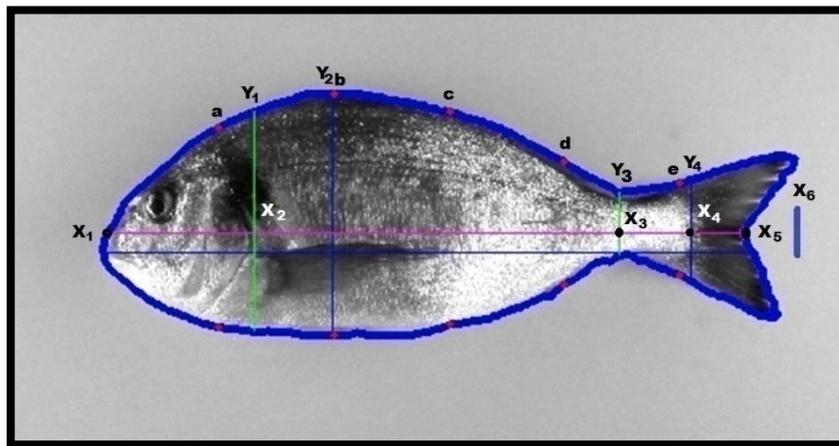
At harvest size (700 dph), a sample of fish from PCTM (56 fish), ADSA (1,034 fish) and PIMSA (589 fish) were slaughtered and growth, carcass as well as meat and fish quality traits were measured. Alive broodstocks (464 from PCTM, and 336 from IFAPA) were also sampled for growth traits. At this age, some males appeared were fluent. Traits were characterized according the standardized methodologies defined in AQUAEXCEL-ATOL (AQUAEXCEL project, 2013). The condition factor (CF) was calculated according to the ATOL:0001653 protocol ( $100 \times \text{body weight}[\text{g}] \times \text{fork length}^{-3}[\text{cm}]$ ). The deformities were visually assessed by direct observation (ATOL: 0000087). Specific growth rate by ATOL: 0001662 ( $\text{SGR} = 100 \times \ln(\text{final body weight}) - \ln(\text{initial body weight}) \times \text{time interval}^{-1}$ ) also was calculated. For percentage of lipids in the muscle was estimated by using the device Distell Fish Fatmeter - FFM (Distell.com, West Lothian, Scotland) making four readings, two on each side of the fish. Then, viscera were removed manually and gutted body weight was recorded (ATOL: 0001057), and expressed as a percentage of the body weight (dressing percentage, ATOL: 0000548). Fish were manually skinned and filleted without including the nape and the belly flap. Both fillets were weighed together. Fillets were vacuum packaged and frozen at -20 until analysis of the composition of meat, for which the fillets were homogenized and analyzed by the indirect method of near-infrared spectroscopy (near infrared spectroscopy, NIR) using equipment FOODSCAN LAB (FOSS, Denmark) to obtain proteins, moisture and lipids content, as a percentage of fresh muscle. Each fish was

### 3.3 MATERIALS AND METHODS

photographed with a digital camera, side view, in a dark room with controlled light as according to Navarro *et al.* (2016). Later, all pictures were analyzed, in a standardized way, by applying the automatic image analysis IMAFISH\_ML software, developed in MatLab v.7.5 (The Math -Works Inc, Massachusetts, USA) (Navarro *et al.*, 2016). All traits are shown in Table 3-1, and a fish picture indicating length and height measures are depicted Figure 3-1.

**Table 3-1.** The measured traits by IMAFISH\_ML software.

Trait	Abbreviation	Description
Total Lateral Length (cm)	TLL	Distance from x1 to x6, within the horizontal axis (Figure 1).
Caudal Peduncle Height (cm)	CPH	Axis y3 (Figure 1).
Fillet Maximum Length	FilML	Distance from x2 to x3, within the horizontal axis (Figure 1).
Tail-Excluded Length	TaEL	Distance from x1 to x3, within the horizontal axis (Figure 1).
Standard Length (cm)	SL	Distance from x1 to x4, within the horizontal axis (Figure 1).
equidistant Fish Heights	FHA FHB FHC FHD FHE	Total lateral length (TLL) is divided into six equal parts, then, heights of each one of these five points are measured. FHA, FHB, FHC, FHD and FHE are the axes a, b, c, d and e, respectively (Figure 1).



**Figure. 3-1.** Automatically detected points by IMAFISH\_ML software. Lateral view, for the determination of noninvasive technological traits of gilthead sea bream: points x1,x2, x3, x4, x5, x6 of the anteroposterior axis will be used to determine longitudinal traits; y1, y2, y3, y4 and a, b, c, d, e are dorsoventral axes, that will be used to determine height traits.

#### 3.3.3 Genotyping and familial assignments

DNA was extracted from a fragment of the caudal fin preserved in 1 ml of absolute ethanol by using a DNeasy kit Nucleospin<sup>®</sup> 96 tissue (MACHEREY-NAGEL), using a TECAN robot (Tecan Schweiz AG, Switzerland), and Freedom Evowar<sup>®</sup> *Standard* v2.5 software, following the manufacturer's instructions. Extracted DNA was stored at -20°C in the provided buffer until use. DNA quantity and quality were determined using a *NanoDrop 8000 spectrophotometer v.3.7* (Thermo Fisher Scientific), and quality checked by agarose gel at 1% to 10 v/cm. All breeders and offspring were characterized genetically using the SMsa-1 multiplex PCR (Super Multiplex *Sparus aurata*), developed by Lee-Montero *et al.* (2013) containing 11 specific microsatellite markers. Genotypes were determined by *GENEMAPPER v.3.7* software, and using the bin set kit (SMsa1 kit). Family relationships between breeders and offspring were determined by the exclusion method using *VITASSIGN (v8.2.1)* software (Vandeputte *et al.*, 2006), considering the breeders' gender as unknown.

#### 3.3.4 Data analysis

Prior to do the genetic parameters estimation, all quantitative data were analyzed for normality and variance homogeneity. The effects of fixed factors (tracking, culturing system, origin), were studied by General Linear Model using *SPSS v.18* software (SPSS, Chicago, IL, USA). Variance components of all traits considered in this study, to obtain genetic parameters (heritabilities and correlations), were estimated by the Restricted Maximum Likelihood Method following the model,

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

$y$  is the recorded data recorded on the studied traits,  $\beta$  the fixed effects (tracking, culturing system, origin),  $u$  the random animal effect, and  $e$  the error. Genotype–environment interactions (GxE) at harvest size (700 days), were estimated by genetic correlation between two facilities (ADSA and PIMSA), by considering the particular trait of interest as a different trait at each facility (Falconer and Mackay, 1996). All genetic estimates were carried out using VCE (v 6.0) software (Neumaier and Groeneveld, 1998; Groeneveld *et al.*, 2010).

The magnitude of estimated heritability was established following the classification suggested by Cardellino and Rovira (1987) as: low (0.05–0.15), medium (0.20–0.40), high

### **3.3 MATERIALS AND METHODS**

---

(0.45–0.60) and very high ( $>0.65$ ). The magnitude of correlation was established following the classification indicated by Navarro *et al.* (2009a) as: low (0–0.40), medium (0.45–0.55) and high (0.60–1), regardless if positive or negative.

## **3.4 RESULTS**

---

### **3.4.1 Genotyping and parental assignment**

The use of multiplex SMsa1 PCR using the exclusion method, with a maximum of two tolerated errors, provided successful parental assignment of 87 % for descendants cultured in cages at Canary Islands, and 88% in the estuary at Andalusia. The remaining of descendants (13% and 12% from cage and estuary, respectively), were assigned to two possible breeder couples, but they were not excluded from the genetic analyses, being included in the relationship matrix as ‘just one known parental breeder’. Regarding the breeders’ contribution, from total elite breeders (123), 83 breeders (67%), 40 females and 43 males, contributed to produce a total of 201 full-sib families, and 59 half-sib families (32 of paternal and 27 maternal). From 127 control breeders, 83 breeders (65%), 42 females and 41 males, contributed to produce a total of 123 full sib families, and 50 half-sib families (27 paternal and 23 maternal).

### **3.4.2 Phenotyping**

The phenotypic results for growth (body weight, fork length and condition factor), carcass (dressing percentage and fillet weight), body composition (proteins, fat and moisture in muscle), and noninvasive technological traits in oceanic-cage and estuary are shown in Table 3-2. Fish cultured in estuary showed higher values for most of growth, carcass, flesh composition and noninvasive technological traits than those cultured in cage, except for dressing percentage, SGR and Moisture values variables.

### **3. ESTIMATES OF GENETIC PARAMETERS FOR NEW NONINVASIVE TECHNOLOGICAL TRAITS**

**Table 3-2** Phenotypic result for growth, carcass, flesh composition and noninvasive technological traits (mean± standard error), for gilthead sea bream at harvest size after growth-out in oceanic-cage or in the estuary pond facilities

<b>Trait</b>	<b>Cage</b>	<b>Estuary</b>
Weight	313.14 ± 3.90	439.91 ± 3.10
Length	24.34 ± 0.10	27.01 ± 0.07
CF	2.04 ± 0.00	2.21 ± 0.01
SGR	0.75 ± 0.00	0.66 ± 0.00
Dressing (%)	92.20 ± 0.23	90.91 ± 0.13
FilletW	98.09 ± 1.24	150.41 ± 1.57
Proteins (%)	19.38 ± 0.03	20.84 ± 0.05
Moisture (%)	73.18 ± 0.08	68.77 ± 0.09
Lipids (%)	6.55 ± 0.06	8.71 ± 0.11
FFM (%)	9.36 ± 0.11	NM
TLL	25.98 ± 0.09	29.38 ± 0.08
CPH	2.27 ± 0.01	2.97 ± 0.03
FilML	13.21 ± 0.05	15.90 ± 0.06
TaEL	19.49 ± 0.07	22.17 ± 0.07
SL	21.98 ± 0.08	25.08 ± 0.08
FHA	7.15 ± 0.03	8.20 ± 0.05
FHB	8.95 ± 0.03	10.72 ± 0.05
FHC	7.87 ± 0.03	9.36 ± 0.03
FHD	4.77 ± 0.03	5.94 ± 0.05
FHE	3.34 ± 0.03	3.92 ± 0.05

(SGR) Specific growth rate, (CF) Condition factor, (FFM) Fish Fat Meter, NM: not measured.

#### **3.4.3 Heritabilities and correlations**

Estimates of heritabilities for each trait and genetic and phenotypic correlations for traits are shown in Table 3-3. Heritabilities ranged from 0.09 to 0.25 for growth traits, from 0.04 to 0.35 for carcass traits, from 0.08 to 0.27 for body composition traits, and from 0.04 to 0.40 for noninvasive technological traits.

##### *Within group of traits*

The genetic correlations between growth traits were mainly medium and high. Between carcass traits were medium, and between body composition traits: for moisture

## 3.4 RESULTS

---

versus lipids content was negative and high, for proteins content with moisture and lipids were negative and low. Genetic correlations between noninvasive technological traits were high.

The phenotypic correlations between growth traits were low-medium except for weight versus length, which was high. Between carcass traits, they were low, while between body composition traits: for moisture versus lipids content was negative and high, for proteins versus moisture and lipids were negative and low. The phenotypic correlations between technological traits were mainly medium-high, except for CPH versus FHA or FHB, FilML versus FHB or FHC, FHD versus FHA or FHB. For FHA versus FHE were low, and FHB versus FHE was negative and low.

### *Between group of traits*

Genetic correlations between growth and carcass traits, the estimations were medium and high, except for length versus dressing (%) which was low. Between growth and body composition traits were generally low-medium, except for growth traits with moisture, which were medium and negative. Between noninvasive technological with growth traits, all genetic correlation were medium-high. For all technological traits with carcass traits, their genetic correlations were high with fillet weight and low with dressing (%). Between noninvasive technological and body composition traits, were mainly medium with proteins or lipids, and medium and negative with moisture.

The phenotypic correlations between growth with carcass traits, were medium-high in the case of fillet weight, and low and negative for dressing %. Between growth and body composition traits, were generally low, except with moisture, which were medium and negative. Concerning genetic correlation between growth and technological traits, all estimates were medium-high. Between carcass traits and technological traits, were high for fillet weight and low for dressing %. For technological and body composition traits, were mainly low and positives with proteins and lipids content, and low and negative with moisture.

**Table 3-3** Phenotypic correlations (below the diagonal), genetic correlations (above the diagonal, value  $\pm$  standard error), and heritabilities (in bold at the diagonal, value  $\pm$  standard error) for growth, carcass, flesh composition and technological traits in gilthead sea bream, at harvest size.

	Weight	Length	CF	SGR	Dressing %	FillerW	Proteins	Moisture	Lipids	FFM	TLL	CPH	FiML	TaEL	SL	FHA	FHB	FHC	FHD	FHE
Weight	0.25 $\pm 0.06$	0.98 $\pm 0.01$	0.80 $\pm 0.10$	0.81 $\pm 0.09$	0.49 $\pm 0.32$	0.98 $\pm 0.01$	0.31 $\pm 0.25$	-0.58 $\pm 0.13$	0.48 $\pm 0.15$	0.59 $\pm 0.14$	1.00 $\pm 0.01$	0.97 $\pm 0.05$	0.99 $\pm 0.01$	1.00 $\pm 0.01$	1.00 $\pm 0.00$	0.96 $\pm 0.05$	0.97 $\pm 0.03$	0.98 $\pm 0.03$	0.95 $\pm 0.04$	0.98 $\pm 0.07$
Length	0.93	0.22 $\pm 0.05$	0.67 $\pm 0.16$	0.80 $\pm 0.10$	0.26 $\pm 0.26$	0.95 $\pm 0.03$	0.33 $\pm 0.26$	-0.50 $\pm 0.14$	0.40 $\pm 0.17$	0.56 $\pm 0.14$	1.00 $\pm 0.00$	0.97 $\pm 0.05$	1.00 $\pm 0.01$	1.00 $\pm 0.01$	1.00 $\pm 0.00$	0.95 $\pm 0.05$	0.97 $\pm 0.03$	0.95 $\pm 0.04$	0.92 $\pm 0.05$	0.96 $\pm 0.10$
CF	0.46	0.09	0.09 $\pm 0.03$	0.59 $\pm 0.15$	0.67 $\pm 0.36$	0.81 $\pm 0.10$	0.15 $\pm 0.29$	-0.77 $\pm 0.10$	0.73 $\pm 0.15$	0.64 $\pm 0.18$	0.56 $\pm 0.22$	0.65 $\pm 0.19$	0.65 $\pm 0.19$	0.64 $\pm 0.18$	0.63 $\pm 0.17$	0.67 $\pm 0.15$	0.68 $\pm 0.15$	0.69 $\pm 0.16$	0.71 $\pm 0.18$	0.62 $\pm 0.25$
SGR	0.51	0.45	0.28	0.17 $\pm 0.04$	0.57 $\pm 0.25$	0.71 $\pm 0.11$	0.16 $\pm 0.20$	-0.57 $\pm 0.12$	0.52 $\pm 0.12$	0.55 $\pm 0.17$	0.73 $\pm 0.12$	0.69 $\pm 0.16$	0.74 $\pm 0.12$	0.77 $\pm 0.12$	0.74 $\pm 0.15$	0.60 $\pm 0.15$	0.61 $\pm 0.15$	0.67 $\pm 0.14$	0.76 $\pm 0.13$	0.70 $\pm 0.17$
Dressing %	-0.12	0.03	-0.46	-0.19	0.04 $\pm 0.02$	0.48 $\pm 0.30$	0.51 $\pm 0.41$	-0.22 $\pm 0.27$	0.11 $\pm 0.26$	-0.02 $\pm 0.38$	0.01 $\pm 0.26$	0.14 $\pm 0.34$	0.19 $\pm 0.35$	0.22 $\pm 0.34$	0.24 $\pm 0.34$	-0.04 $\pm 0.33$	-0.04 $\pm 0.32$	0.07 $\pm 0.26$	0.25 $\pm 0.26$	0.17 $\pm 0.38$
FillerW	0.9	0.85	0.45	0.46	0.16	0.35 $\pm 0.07$	0.43 $\pm 0.21$	-0.76 $\pm 0.08$	0.66 $\pm 0.07$	0.72 $\pm 0.10$	0.94 $\pm 0.06$	0.96 $\pm 0.05$	0.99 $\pm 0.02$	0.98 $\pm 0.02$	0.99 $\pm 0.01$	0.94 $\pm 0.04$	0.96 $\pm 0.03$	0.94 $\pm 0.06$	0.94 $\pm 0.04$	0.92 $\pm 0.13$
Proteins	0.26	0.21	0.23	0.14	0.03	0.27	0.08 $\pm 0.04$	-0.15 $\pm 0.24$	-0.03 $\pm 0.23$	-0.26 $\pm 0.26$	0.15 $\pm 0.24$	0.27 $\pm 0.24$	0.19 $\pm 0.25$	0.13 $\pm 0.28$	0.30 $\pm 0.27$	0.21 $\pm 0.18$	0.22 $\pm 0.24$	0.16 $\pm 0.26$	0.22 $\pm 0.23$	0.30 $\pm 0.29$
Moisture	-0.57	-0.46	-0.48	-0.37	-0.01	-0.62	-0.07	0.29 $\pm 0.07$	-0.98 $\pm 0.01$	-0.91 $\pm 0.05$	-0.57 $\pm 0.15$	-0.55 $\pm 0.19$	-0.67 $\pm 0.11$	-0.67 $\pm 0.11$	-0.66 $\pm 0.12$	-0.64 $\pm 0.12$	-0.65 $\pm 0.12$	-0.61 $\pm 0.14$	-0.70 $\pm 0.12$	-0.53 $\pm 0.23$
Lipids	0.43	0.35	0.36	0.28	0	0.48	-0.3	-0.88	0.25 $\pm 0.06$	0.95 $\pm 0.04$	0.46 $\pm 0.17$	0.53 $\pm 0.18$	0.55 $\pm 0.15$	0.57 $\pm 0.14$	0.54 $\pm 0.15$	0.51 $\pm 0.14$	0.57 $\pm 0.13$	0.55 $\pm 0.15$	0.62 $\pm 0.14$	0.39 $\pm 0.21$
FFM	0.63	0.58	0.44	0.43	0.16	0.64	0.14	-0.73	0.75	0.27 $\pm 0.08$	0.68 $\pm 0.15$	0.70 $\pm 0.16$	0.74 $\pm 0.11$	0.72 $\pm 0.12$	0.71 $\pm 0.12$	0.62 $\pm 0.14$	0.62 $\pm 0.14$	0.76 $\pm 0.12$	0.79 $\pm 0.13$	0.67 $\pm 0.19$
TLL	0.61	0.64	0.13	0.31	0.02	0.58	0.11	-0.27	0.2	0.32 $\pm 0.07$	0.25 $\pm 0.07$	0.99 $\pm 0.02$	0.99 $\pm 0.01$	1.00 $\pm 0.00$	1.00 $\pm 0.01$	0.96 $\pm 0.04$	0.98 $\pm 0.03$	0.99 $\pm 0.01$	0.97 $\pm 0.02$	0.97 $\pm 0.03$
CPH	0.45	0.43	0.21	0.21	-0.03	0.44	0.1	-0.19	0.17	0.21	0.75	0.19 $\pm 0.06$	0.99 $\pm 0.02$	0.98 $\pm 0.03$	0.99 $\pm 0.03$	0.91 $\pm 0.06$	0.93 $\pm 0.06$	0.99 $\pm 0.02$	0.97 $\pm 0.03$	1.00 $\pm 0.01$
FiML	0.69	0.71	0.18	0.35	0.02	0.65	0.12	-0.33	0.25	0.41	0.93	0.72 $\pm 0.08$	0.29 $\pm 0.09$	1.00 $\pm 0.00$	1.00 $\pm 0.00$	0.97 $\pm 0.04$	0.99 $\pm 0.02$	0.99 $\pm 0.01$	0.97 $\pm 0.02$	0.96 $\pm 0.05$
TaEL	0.76	0.79	0.21	0.36	0.03	0.71	0.14	-0.35	0.26	0.43	0.85	0.64	0.93	0.29 $\pm 0.07$	1.00 $\pm 0.00$	0.96 $\pm 0.03$	0.97 $\pm 0.02$	0.98 $\pm 0.01$	0.97 $\pm 0.02$	0.96 $\pm 0.05$
SL	0.75	0.78	0.19	0.35	0.03	0.7	0.15	-0.33	0.25	0.42	0.87	0.64	0.92	0.98	0.26 $\pm 0.07$	0.96 $\pm 0.03$	0.98 $\pm 0.03$	0.98 $\pm 0.02$	0.98 $\pm 0.02$	0.98 $\pm 0.07$
FHA	0.63	0.61	0.27	0.28	0.01	0.57	0.17	-0.33	0.24	0.57	0.53	0.36	0.56	0.6	0.61 $\pm 0.05$	0.96 $\pm 0.03$	0.96 $\pm 0.03$	0.96 $\pm 0.02$	0.90 $\pm 0.07$	0.92 $\pm 0.10$
FHB	0.71	0.67	0.35	0.32	0.01	0.65	0.2	-0.4	0.3	0.56	0.44	0.27	0.5	0.61	0.92	0.97 $\pm 0.06$	0.99 $\pm 0.03$	0.97 $\pm 0.03$	0.93 $\pm 0.10$	0.93 $\pm 0.05$
FHC	0.71	0.69	0.31	0.35	0.02	0.69	0.13	-0.36	0.28	0.42	0.93	0.73	0.9	0.85	0.86	0.57	0.54	0.40 $\pm 0.10$	0.99 $\pm 0.01$	0.97 $\pm 0.03$
FHD	0.58	0.57	0.26	0.26	0.04	0.58	0.09	-0.3	0.25	0.4	0.74	0.62	0.75	0.72	0.71	0.18	0.2	0.83 $\pm 0.10$	0.22 $\pm 0.01$	0.92 $\pm 0.07$
FHE	0.3	0.3	0.1	0.14	-0.02	0.3	0.04	-0.09	0.05	0.09	0.79	0.8	0.7	0.55	0.58	0.07	-0.04	0.72 $\pm 0.07$	0.7 $\pm 0.09$	0.7 $\pm 0.04$

## 3.4 RESULTS

### 3.4.4 Genotype - environment interaction

The genetic correlations for each trait at harvest size, measured in both growth-out systems (oceanic-cage in Canary Island and estuary in Andalusia) are shown in Table 3-4. Correlations were medium-high for all traits (between 0.46 and 1.00), except for FHA and FHB (0.05 and 0.16, respectively).

**Table 3-4.** Genotype-environment interaction for growth, carcass, flesh composition and technological traits in gilthead sea bream at harvest size, and reared in cage and estuary, quantified by genetic correlation (value  $\pm$  standard error).

<b>Traits</b>	<b>Genetic correlations <i>Cage vs Estuary</i></b>
Weight	0.46 $\pm$ 0.24
Length	0.60 $\pm$ 0.21
CF	0.74 $\pm$ 0.38
SGR	0.64 $\pm$ 0.29
Dressing (%)	1.00 $\pm$ 0.00
FilletW	0.53 $\pm$ 0.28
Proteins (%)	1.00 $\pm$ 0.00
Moisture (%)	0.95 $\pm$ 0.17
Lipids (%)	1.00 $\pm$ 0.00
TLL	0.73 $\pm$ 0.17
CPH	0.90 $\pm$ 0.14
FilML	0.73 $\pm$ 0.19
TaEL	0.61 $\pm$ 0.21
SL	0.57 $\pm$ 0.24
FHA	0.05 $\pm$ 0.53
FHB	0.16 $\pm$ 0.42
FHC	0.86 $\pm$ 0.12
FHD	0.61 $\pm$ 0.41
FHE	0.75 $\pm$ 0.51

### **3.5.1 Genotyping and parental assignment**

There exist an increasing interest for developing genetic breeding programs in gilthead sea bream, particularly by the feasibility to characterize some important traits combined the pedigree reconstruction based on genetic markers. These tools are essential for quantitative programs in which the breeder's contribution remains unknown and the genealogy can only be inferred by analysis of microsatellite marker sets (Navarro *et al.*, 2008, 2009a). Breeding programs in gilthead sea bream production system are mainly designed under mass-spawning (Chavanne *et al.*, 2016; Janssen *et al.*, 2016). Spawns with a high number of eggs are desirable in order to get high-quality larvae from a management point of view, but a high number of contributions in terms of number of breeders and offspring per breeder are relevant from genetic point of view. In this study, a high single-parental pair assignment has been obtained for mass-spawning from different broodstocks, with similar genetic background. Navarro *et al.* (2009b), using only spawn from one day, assigned 100% offspring to a single-parent pair. Lee-Montero *et al.* (2015), using spawns from two consecutive days, reported a success of 100% in two broodstocks, and 90% in a third broodstock, but this latter has a higher in number of breeders (87%). In this study, using spawns from four consecutive days (with more families than Navarro *et al.*, 2009b, and Lee-Montero *et al.*, 2015), a 87.5% assignments to a single-parent pair was obtained. This result is corroborated by preliminary results obtained for subsample of 204 descendants grown until one kilo size to be harvested, where 91% was obtained for parental assignment to a single-parent pair (data not shown). So, a negative correlation between number of families and parental assignment success to a single-parent pair exists. However, assignment to a single-parent pair or two single-parent pairs was enough for genetic matrix reconstruction, and genetic parameter estimations as previously demonstrated (Lee-Montero, 2012; García-Celdrán *et al.*, 2015a,b,c; Lee-Montero *et al.*, 2015). In addition, animal selection requires to control the inbreeding rate and a high and homogeneous number of breeders contributing and descendants are needed (Falconer and Mackay, 1996). This scenery can be solved adding a second, specific and highly efficient multiplex reaction with new markers that can increase the exclusion power for assignment (Lee-Montero *et al.*, 2013). However, a balance between benefit and cost should be considered due to genotyping costs.

### 3.5.2 Phenotyping

The growth traits, such as food conversion, condition factor and specific growth rate are the most important economic traits in the animal production, because they are directly linked to the production costs (Jover, 2007). However, food conversion is difficult to measure under industrial conditions and indirect selection using weight or length at different ages is adequate (Kinghorn, 1983). In fact, the phenotypic values for growth traits obtained in this study coincide with those described by Navarro *et al.* (2009a) and Lee-Montero *et al.* (2015). Intriguingly, the lowest growth values were recorded in fish reared in Canary Islands, possibly due to the cage location, in which feeding was sometimes difficult due to the environment conditions. Nevertheless, estuary ponds system under semi-intensive conditions used satisfactory food sourced both natural feed (shrimps) and commercial pellets. In fact, a random fish sample grown at the PCTM facility, and fed regularly under controlled conditions, showed for the same age a 51% more than their counterparts in cages. These data demonstrate the importance of optimizing production conditions to obtain the maximal performance for similar genetic backgrounds.

The performance traits are important from an economic point of view, and highly appreciated in the aquaculture industry (Neira *et al.*, 2004). Dressing percentage values obtained in this study were high, consistent with those obtained by other authors in gilthead sea bream, also reared in the same geographical area (Ginés, 1997; Oliva, 2007; Navarro *et al.*, 2009a), reporting a tendency with fish size. In fact, by using only fish populations bred in Canary Island (to avoid some effects), the highest values (95.01%) have been detected in weightier fish (946.27 g) genetically related with fish of the present study (data no shown). Regarding fillet weight, the results of the present study were low, especially those fish reared at Canary Island, due to low fish weight at slaughtering size, which was previously reported and explained. In fact, there is a high correlation between fish weight and fillet weight (0.99), when fish of this study are compared with other fish populations cultured in the same region (Navarro *et al.*, 2009a; Lee-Montero, 2012). However, concerning fillet weight in %, the results of this study, which were 31.1% and 34.2% for cage and estuary, respectively (weighed mean of 32.3%), were in concordance with Navarro *et al.* (2009a), 35.4%, and Lee-Montero (2012), 37.8%. Thus, a high correlation of 0.79 is estimated, between fish weight and fillet weight %, when all data from the same region are considered.

Nowadays, there is a growing interest in term of quality traits, especially with the health benefits of feeding on fish, mainly due to the protective effect of fish lipid against cardio-vascular diseases. To determine these traits, the composition of meat as the protein, lipids and moisture content in the muscle were studied (Gjedrem, 1997). In culture gilthead sea bream, fat percentage values reported in previous studies were highly variable, ranging from 2 to 11%, and inversely proportional to moisture, ranging from 74 to 68% (Robaina *et al.*, 1997; Flos *et al.*, 2002; Ginés *et al.*, 2004; Grigorakis, 2007; Navarro *et al.* 2009b; Lee-Montero, 2012). These values are consistent with the results obtained in this study. However, comparing gilthead sea bream populations cultured in the same way and location (Ginés *et al.*, 2004; Navarro *et al.*, 2009b; Lee-Montero, 2012), and this study, can be appreciated differences in the mean values, according the methodology used; 9.47% for FFM methodology (Lee-Montero, 2012, and this study), 7.78% for chemical methodology (Ginés *et al.*, 2004; Navarro *et al.*, 2009b), and 6.37% for NIR (Lee-Montero, 2012, and this study). So, seems that NIR methodology estimates values closer to chemical methodology (Official Methods of Analysis; AOAC, 2016) than FFM methodology, although other causes are like feed composition cannot be discarded. Fish Fat Meter (FFM), is an indirect method (noninvasive, fast, convenient, easy and economic) that uses the relationship between the water content and fat content to estimate the fat percentage in muscle (Nielsen *et al.*, 2005). It showed greater values for fat percentages than the NIR method, when both measure methods are done on the same samples, as observed by Lee-Montero (2012), 97% higher, and in this study, 42% higher. Similarly, protein percentages were similar to those reported by Ginés *et al.* (2004) and Lee Montero (2012). Moreover, comparing values according measure methods, chemical and NIR, protein contents were exactly the same, 21.6%.

The external appearance of a gilthead sea bream reflects to some extent its life story, for example, biometric studies in wild specimens show significant differences with respect to individuals farmed in intensive systems, i.e. shorter, wider and taller bodies (Grigorakis, 2007). But when a big data matrix is needed, as it is the case in genetic improvement, manual methods are prone to a higher number of errors and automatic methods are preferred. Thus, automated visual inspection in the food industry has important advantages from the point of view of cost-effectiveness, consistency, speed and accuracy (Brosnan and Sun, 2004). The morphological traits defined and measured in the present study, are the first reported in gilthead sea bream. The morphological variable estimations by IMAFISH showed a lower variation than manual methods, as it is the case of fish length, where determination of

standard length by IMAFISH (SL) showed a coefficient of variation lower, 11%, than the manual method.

#### **3.5.3 Heritabilities and correlations**

##### *Heritability*

The growth traits (weight and length) are highly dependent on factors related with feeding and rearing conditions but they usually have a medium-high genetic determination in most livestock animals (Cardellino y Rovira, 1987), where additive genetic variation play a major rule. In gilthead sea bream, Knibb *et al.* (1997) estimated realized heritabilities for weight at harvest size, ranged between medium (up-selection) and high (down-selection), after a single generation of divergent selection against a control population. Navarro *et al.* (2009a), in an industrial lot fattened in two facilities, described intermediate values of heritability for weight and length, from fingerling to adult. Lee-Montero (2012), also for an industrial lot grown in only one locality (Canary Island) belonging to the first generation of PROGENSA breeding program, and to the same sizes range, reported low and high heritability values (fingerling and adult, respectively). Similarly, Fernandes *et al.* (2010) described high heritability value (0.45), at adult, for industrial lot cultured in only one facility. When lots of fish were constituted with the same families and grown at different localities along Spanish coast, heritability estimations for adults were lower, medium values (Lee-Montero, 2012). García-Celdrán *et al.* (2015c), also in an industrial lot, found low and medium heritability values for weight and length, in fingerling and adult (at harvest size). Data of the present study, which belong to the second generation of PROGENSA and where selection pressure was carried out through the weight at harvest size in two different localities, showed similar and consistent medium heritabilities. It is in concordance with inbreeding control of both generations, because effective population sizes were similar (157 and 155, for first and second generations, respectively). For compactness or condition factor (CF), heritability of this study was low (0.09), which is agree with values reported by Navarro *et al.* (2009a) (0.05-0.13) from fingerling to adult. Once again, in lots cultured in only one locality showed higher heritabilities according Lee-Montero (2012) and García-Celdrán *et al.* (2015a), who reported moderate values (0.20 and 0.18, respectively). All of these results were lower than the results obtained by other authors in other species, such as in red drum (*Sciaenops ocellatus* L.) by Saillant *et al.* (2007) (0.28), in common carp by Vandeputte *et al.* (2004) (0.37), and in sea bass by Dupont-Nivet *et al.* (2008) (0.19). The general tendency of gilthead

sea bream to exhibit lower heritabilities for CF in comparison with other species could be related with the positive allometry towards the height (Ginés, 1997).

Concerning carcass traits, heritability estimates described in different species oscillated in a wide range. For dressing percentages, values ranged from 0.02 (Powell *et al.* 2008) to 0.45 (Kause *et al.* 2002). In gilthead sea bream, Navarro *et al.* (2009a) obtained medium values (0.31) whereas Lee Montero (2012) and García-Celdrán *et al.* (2015a) estimated low values (0.06 and 0.07, respectively), like in this study (0.04). This wide difference between estimations of Navarro *et al.* (2009a) and other authors, including the present study, can be explained because lots of Lee Montero (2012), García-Celdrán *et al.* (2015a) and this work came from the same genetic background of PROGENSA. For fillet weight, the results also show great variation coming from, possibly, because there is a great variability in terms of measure methods. In gilthead sea bream, Navarro *et al.* (2009a), García-Celdrán *et al.* (2015a) and Lee Montero (2012) reported low and high values (0.15, 0.17 and 0.41, respectively). In this study, medium values for fillet weight were estimated (0.35) reporting a robust genetic basis and high potential of filleting market (Luna *et al.*, 2006).

In gilthead sea bream, Janssen *et al.*, (2016) reported that product quality traits are the third most frequently selected traits in breeding programs. That is because the industry and consumers are paying high attention to meat quality since aquaculture products are always compared with those from wild fisheries. The medium heritabilities values of lipids content and moisture obtained by this study agree with the estimates reported by Lee-Montero (2012) (0.17 and 0.20, respectively) and García-Celdrán *et al.* (2015a) (0.31 and 0.24, respectively). Navarro *et al.* (2009b) reported lower values (0.05 and 0.09, respectively). The highest values in this study, similar to by Lee-Montero (2012) and García-Celdrán *et al.* (2015a), are probably due to technical methods and genetic background. Thus, Navarro *et al.* (2009b) determined these parameters by chemical and manual methods, while in the latter studies; they were determined by the NIRs methodology. Moreover, fish populations used by Lee-Montero (2012), García-Celdrán *et al.* (2015a), and this study belong to different samples belonging to PROGENSA breeding program. Regarding the percentage of protein, the heritability of this study was low (0.08) that coinciding with those estimated by Lee-Montero (2012) (0.06), and García-Celdrán *et al.* (2015b) (0.03). It reflects the difficulty presented by this trait to improve by direct methods.

### **3. ESTIMATES OF GENETIC PARAMETERS FOR NEW NONINVASIVE TECHNOLOGICAL TRAITS**

---

In gilthead sea bream, morphological traits are related with growth, carcass, meat and fish quality (Lee-Montero, 2012). They are relevant because this species is mainly commercialized as whole fish, and the visual perception of foods in general and aquatic foods in particular, is extremely important for the consumer (Gumus *et al.*, 2011). Image processing techniques have been used increasingly for food quality evaluation in recent years (Du and Sun, 2004). Since, image analysis reduces the sources of variation between measurements, if methodology is correctly standardized, and increases the accuracy of genetic parameter estimates (Blonk *et al.*, 2010). In the present study, ten out of the 27 variables determined by image analysis program developed by Navarro *et al.* (2016), and previously do not studied, were selected in order to know their additive genetic variation and relationships with essential biological traits, actually selected in populations of selection programs (Chavanne *et al.*, 2016; Janssen *et al.*, 2016). Heritabilities of ten noninvasive technological traits (TLL, CPH, FilML, TaEL, SL, FHA, FHB, FHC, FHD, and FHE) were studied in two fish lots at industrial scale, in different culturing systems (cage and estuary). All noninvasive technological traits, connected with different fish heights in gilthead sea bream (FHA, FHB, FHC, FHD and FHE), reported heritabilities ranged between moderate (0.17 for FHA) and high (0.40 for FHC), except for FHE trait that it was low (0.09). These results suggest that is possible to change the gilthead sea bream shape, by selection, according to the commercial interests of companies, to fulfill market demands. Regarding length-related traits using noninvasive measurements by IMAFISH (TLL, FilML, TaEl and SL), values were similar to those obtained by manual methodology (24.3 and 27.0 cm for length in cage and estuary, respectively, estimated manually, versus 22.0 and 25.1 cm for standard length in cage and estuary, respectively, measured by IMAFISH), but heritability was improved, as average 24% by IMAFISH software.

#### *Genetic correlation*

Genetic correlation between growth traits (weight, length, CF, SGR) obtained in this study were high and positive, as expected and in concordance with as previously described (Navarro *et al.* 2009a; Fernandes *et al.*, 2010; Lee-Montero *et al.* 2015; García-Celdrán *et al.* 2015a). Only genetic correlations between length and CF have a tendency to be lower, like also described by Navarro *et al.* (2009a), Lee-Montero *et al.* (2015) and García-Celdrán *et al.* (2015a), probably affected because CF is a derivate trait where length suffers a cubic transformation. Growth traits were genetically correlated with all studied noninvasive technological traits (from 0.60 for FHA-SGR to 1.00 for weight-TLL, weight-TaEL, weight-

SL, length-TLL, length-FilML, length-TaEL and length-SL). High heritabilities and genetic correlations of noninvasive technological traits, between them and versus growth traits, suggest that indirect selection for growth traits through noninvasive technological traits is available, at the same time that higher number of fish candidates can be evaluated with minimum cost. Furthermore, it increases the genetic gain and reduces the inbreeding rate (Sonesson *et al.*, 2012)

Regarding the genetic correlations between carcass and growth traits; fillet weight and weight/length values were high and positive, as previously observed in gilthead sea bream and other species (Gjerde and Gjedrem, 1984; Kause *et al.*, 2002; Neira *et al.*, 2004; Doupé and Lymbery, 2005; Rutten *et al.*, 2005; Kause *et al.*, 2007; Kocour *et al.*, 2007; Powell *et al.*, 2008; Navarro *et al.* 2009a; Lee-Montero, 2012; García-Celdrán *et al.*, 2015a). Correlations between dressing percentages and weight/length were medium (0.26-0.67), in agreement with previous studies (Doupé and Lymbery, 2005; Rutten *et al.*, 2005; Kocour *et al.*, 2007). So, direct selection for weight or length, which are less invasive than fillet weight (with higher heritability than weight and length), should increase, in any sense, the feed efficiency. Intriguingly, other works in gilthead sea bream found low or negative genetic correlation estimates between carcass and growth traits (Navarro *et al.* 2009a; Lee-Montero, 2012; García-Celdrán *et al.*, 2015a). This discrepancy between studies can be due fish size at harvest, since fish produce proportionally more bone than meat with age in some populations, due to high negative genetic correlation between gutted weight and fillet weight-% (Navarro *et al.*, 2009a), or more meat proportionally, as denoted by high and positive genetic correlation between gutted weight and fillet weight-% (Lee-Montero, 2012). Corroboration of absolute and signs for these values should be confirmed by analysis of fish populations at higher sizes, like one kilo, discriminating between both (meat and bone) along development. In this study, carcass traits reported high and positive or low and positive values of genetic correlations between dressing-% or fillet weight versus noninvasive technological traits, respectively. Bearing in mind that FHC showed the highest heritability value (14% higher than fillet weight and 10 fold higher than dressing-%), and both carcass traits were positively correlated, noninvasive direct selection for FHC trait would generate a similar indirect selection response on fillet weight that direct selection for this last trait (0,4% higher indirect over direct selection). However, indirect selection of dressing-% through fillet weight would produce a selection response 41% higher than direct selection for dressing-%. So, direct selection for FHC, in noninvasive way, would produce similar selection response for fillet

### **3. ESTIMATES OF GENETIC PARAMETERS FOR NEW NONINVASIVE TECHNOLOGICAL TRAITS**

---

weight but a linked response for dressing-% trait, through its genetic correlation with fillet weight, because directly it would be scarce due to its very low heritability (0.04).

Respect to the genetic correlations of quality traits, values between lipids and moisture content were high and negative, coinciding with those described in both gilthead sea bream and other species (Iwamoto *et al.*, 1990; Kause *et al.*, 2002; Quinton *et al.*, 2007; Navarro *et al.*, 2009b; Lee-Montero, 2012). Lee Montero (2012) found a high and negative correlation (-0.96) between protein and lipids content, however, in this study were negative but low and with a high standard error ( $-0.03 \pm 0.23$ ). So, this result should be consolidated with other studies and populations. However, positive genetic correlations between quality with growth traits of this study are in agreement with the results obtained by Lee-Montero (2012). Moreover, in this study, noninvasive technological traits reported high and negative genetic correlations with moisture, medium and positive with lipids content, and low and positive with protein content. These genetic correlations and heritability estimated values would produce higher indirect selection response for quality traits thorough direct selection for technological traits with high heritability, like FHC, but at least it would generate an expected, linked and noninvasive selection response for quality traits.

The use of image analysis is an objective for measuring fish morphological traits. In terrestrial animals, where genetic improvement is well established, the studies reveal that the morphological traits are genetically correlated with production traits (Simm, 1998; Conafe, 2012). On the other hand, the selection for growth traits can alter the shape of the fish through indirect selection responses (Blonk *et al.*, 2010), and also can be accompanied by an increase in the prevalence of body malformations in animal (Gjedrem, 2005), and also in fish depending of their genetic correlations. Gjerde *et al.* (1986; 2005) reported vertebral deformations in Atlantic salmon (0.00-0.36), with genetic correlation between deformity and fish weight, from -0.22 to -0.42, indicating that high genetic growth potential not causes deformity. Kolstad *et al.* (2006) described spinal deformities (kyphosis, lordosis, and scoliosis) in Atlantic cod, 0.27, and their genetic correlations estimated between weight and occurrence of spinal deformity, 0.50, indicating that fast growth should be recognized as a risk factor for deformity incidence. Kettunen and Fjalestad (2007), in Atlantic cod, reported bend on spinal column and pelvic fin deformities, with heritability ranges of 0.33-0.42 and 0.23-0.28, respectively. So these authors recommended to include these traits in genetic selection index. Ando *et al.* (2008) described a number of abdominal vertebrae, heritability of 0.65, and caudal vertebrae, heritability of 0.84, in Masu salmon. The genetic correlation

between both traits was calculated as -0.92. Kocour *et al.* (2006) reported an anal fin deformity with low heritability of 0.07, in common carp. Genetic correlation with others skeletal deformities (mouth and caudal fin) were high, 0.78-0.88. Bardon *et al.* (2009), in European sea bass, estimated heritabilities of 0.33 and 0.12 for lordosis and scoliosis, respectively. Positive genetic correlation between weight and these malformations were detected, from 0.21 to 0.40, where deformities have a negative phenotypic impact on growth. Kause *et al.* (2005) reported low heritability, 0.02, for skeletal deformity (head, neck, back or tail), in rainbow trout. Positive genetic correlation between weight and deformation was detected, 0.18, indicating that when selection is applied for rapid growth an increase in the frequency of developmental disorders is expected. Similar results have been reported in gilthead sea bream by Astorga *et al.* (2004), describing morphological malformations (38 types, including skeletal deformities) with a heritability of 0.74-0.85, for presence-absence of any deformity, and considering that major genes can be playing an important role in abnormalities. Thorland *et al.* (2006; 2015) reported spinal deformity (include several) and jaw deformity in this species, with 0.12 and 0.16 heritability estimations, respectively. Suggesting that malformations traits have to be included in selection processes. Recently, wide studies have been done in this species under the framework of PROGNSA project by Lee-Montero *et al.* (2015) and García-Celdrán *et al.* (2015c). These authors described relevant additive genetic variation for lordosis, operculum and head, genetically and positively correlated with growth traits, suggesting the importance to include their prevalence in selection indexes due to the depreciation suffered for deformed fish, in hatcheries and on-growing companies, during marketing processes. So, consider and develop new noninvasive technological traits for deformity identification, in an automatic way seems really important for the industry, in terms of economic losses prevention.

### 3.5.4 Genotype x environment interaction (GxE)

Gilthead sea bream is produced by using different production systems with large environmental differences among them. So, it is very important in breeding programs, to estimate GxE interactions to avoid their possible detrimental effects on the genetic selection process (Falconer and Mackay, 1996). Interactions may involve changes in rank order for genotypes between environments and changes in the absolute and relative magnitude of the genetic, environmental and phenotypic variances between environments (Bowman, 1972). In fish breeding, the GxE interaction is probably not significant when the genetic correlation of a

### **3. ESTIMATES OF GENETIC PARAMETERS FOR NEW NONINVASIVE TECHNOLOGICAL TRAITS**

---

trait measured in different environments is higher than 0.7 (Sae-Lim *et al.*, 2013). In gilthead sea bream, Navarro *et al.* (2009a), reported genetic correlations between two facilities (tank and oceanic cage, in the same region) of 0.8 for growth traits, and 0.93 for carcass traits. Navarro *et al.* (2009b), for the same facilities, described genetic correlations of  $0.81 \pm 0.22$  for visceral fat,  $0.15 \pm 0.94$  for muscle fat, and  $0.22 \pm 0.98$  for moisture. These results indicated low or absent genetic–environment interaction for growth and carcass traits, including visceral fat. While genetic–environment interaction cannot be discarded for quality traits, which presented the highest standard errors. Lee-Montero *et al.* (2015) reported, also in gilthead sea bream, a high genetic correlations for presence-absence of any deformity among the five facilities (0.65-0.99), including estuaries and oceanic cages, and indicating that G x E interactions were non-relevant. These authors also reported genetic correlation values ranging between 0.63 to 0.94 for length, and from 0.05 to 0.99 for SGR. These results agree with results of this study, where medium-high genetic correlations between oceanic-cage and estuary for all traits GxE (0.46 - 1.00) were estimated, except for FHA and FHB, which were low (0.05 and 0.16 respectively), and GxE interactions cannot be discarded.

## **4. CONCLUSIONS**



## 4. CONCLUSIONS

---

1. Estimates of growth traits (weight, length, condition factor and SGR or specific growth rate), for mass contribution models at small and large scale studied in this work (1DS, 4DL), showed mean values and phenotypic correlations according with fish age at the slaughtering.
2. Growth traits (weight, length, condition factor and SGR), within the mass contribution model 4DL of four consecutive spawns, fish cultured in tanks (PCTM, IFAPA) showed higher values than fish cultured in ocean cage (ADSA) or estuary (PIMSA).
3. Mass contribution model 4DL, belonging to the second generation of PROGENSA breeding program, for "slaughtering weight" criterion, showed mean values of SGR 18% higher than the model 2DL, belonging to the first generation of PROGENSA.
4. The multiplex PCR of 11 microsatellite markers called SMSa1 showed high efficiency inferring the relationship matrix, between breeders and descendants of mass contribution model 4DL of four consecutive spawns, despite presenting a 8 % more families than model of two consecutive spawns (2DL), and 23% more families than model of one spawning (1DL).
5. Mass contribution model 4DL of four consecutive spawns, belonging to the second generation of PROGENSA breeding program, allowed to keep effective population size values higher than 100 (155), and therefore controlling rate of inbreeding per generation below 1% (0.32%).
6. Mass contribution model 4DL of four consecutive spawns, allows a high number of breeders contributing to the descendants, and a high number of families (full and half sibs, maternal and paternal), maximizing the factorial family structure.
7. Estimates of heritability for growth, carcass, body composition and non-invasive new technological traits of the second-generation of PROGENSA breeding program, ranged between low and medium values.
8. Genetic correlations within group of traits were medium and high for growth traits. For carcass traits they were medium. For body composition traits they were: negative and high for humidity versus against lipid content, whereas the protein content from moisture and / or lipids were negative and low. For new non-invasive technology traits, genetic correlations between them were high.
9. The genetic correlations between groups of traits were medium and high between growth and carcass traits, with the exception of length with the dressing %, which was low. Between growth and body composition traits genetic correlations were generally low - medium, except for growth traits with moisture, which were medium and negative. Genetic correlations between non-invasive technological and growth traits were high for fillet weight, and low for dressing-%. Between non-invasive technological and body composition traits were mainly medium with protein or lipid content, and medium and negative with moisture.

## 4. CONCLUSIONS

---

10. Direct selection on non-invasive technological FHC trait (which showed the highest value of heritability of this study), produces indirect selection response for fillet weight, similar to the direct selection on it, which would improve the selection response for dressing-% (which showed the lowest value of heritability of this study), due to the mean genetic correlation between fillet weight and dressing-%.
11. Genetic correlations for each trait at harvest size, measured in both culturing systems, ocean-cage and estuary, were medium-high and positive for all traits except FHA and FHB that were low and positive.
12. The combination of mass contribution model 4DL of four consecutive spawns, with the introduction of new selection criteria through non-invasive technological traits, in the PROGNSA breeding program, would increase: the number of breeders to evaluate at a lower cost, reproductive ability of candidates with high genetic value, optimal control of the rate of inbreeding and genetic gain per generation and year.

## **5. REFERENCES**



## 5. REFERENCE

---

- Adcock, G.J., Bernal Ramírez, J.H., Hauser, L., Smith, P., Carvalho, G.R., 2000. Screening of DNA polymorphisms in samples of archived scales from New Zealand snapper. *J. Fish Biol.* 56, 1283-1287.
- Afonso, J. M., 1996. Programas de Selección Aplicados en Peces. I.T.E.A. 92 a, 177-184.
- Afonso, J. M., Manchado, M., Estévez, A., Ramis, G., Lee-Montero, I., Ponce, M., Sánchez, J. A., Armero, E., Navarro, A., Puertas, M. A., Borrell, Y., García, M., Negrín-Báez, D., Crespo, A. M., Blanco, G., Mariadolores, E., Sánchez, J. J., Martín, N., Aguilera, C., Roo, F. J., Zamorano, M. J., Toro, M. A. 2012. PROGNSA®: development of a genetic improvement program in gilthead sea bream *Sparus aurata* L. between industry and research centers in Spain. Proceedings of AQUA 2012, September 1–5, Prague, Czech Republic.
- Afonso, J.M., Roo, F. J., 2009. Anomalías morfológicas en peces cultivados: heredabilidad y selección. En: *Genética y genómica en acuicultura*. Coord., Martínez, P., Figueras, A. Ed. Publicaciones Científicas y Tecnológicas de la Fundación Observatorio Español de Acuicultura, Madrid, p. 215-240. ISBN, 978-84-00-085537, 527 pp.
- Aho, T., Johanna Rönn, Jorma Piironen, Mats Björklund., 2006. Impacts of effective population size on genetic diversity in hatchery reared Brown trout (*Salmo trutta* L.) populations. *Aquaculture* 253, 244–248.
- 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.
- Aleandri, R., Knibb, W., 1999. Fish genetics and breeding: perspectives for Mediterranean aquaculture. In, Enne, G and Greppi, GF (Eds) *New Species for Mediterranean Aquaculture*. Proceedings of the 33rd International Symposium of Societa Italiana per ilProgresso della Zootechnica, Alghero 1998. Elsevier, Paris.
- Ando, D., Mano, S., Koideim N, Nakajima, M., 2008. Estimation of heritability and genetic correlation of number of abdominal and caudal vertebrae in masu salmon. *Fisheries science*, 74: 293–298.
- Antonello, J., Massault, C., Franch, R., Haley, Ch., Pellizzari, C., Bovo, G., Patarnello, T., De Koning, D.J., Bargelloni, L., 2009. Estimates of heritability and genetic correlation for

## 5. REFERENCE

---

- body length and resistance to fish pasteurellosis in the gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.). *Aquaculture*, 298, 29–35.
- AOAC, 2016. Official Methods of Analysis of AOAC international, 20<sup>th</sup> edition.
- APROMAR, 2015. Fish marine aquaculture in Spain. (<http://www.apromar.es>).
- AquaExcel Project 2013. [http://www.aquaexcel.eu/images/Deliverables\\_2013/aquaexcel\\_d3.2-validated.pdf](http://www.aquaexcel.eu/images/Deliverables_2013/aquaexcel_d3.2-validated.pdf)
- Archer, J. A., Richardson, E. C., Herd, R. M., Arthur, P. F., 1999. Potential for selection to improve efficiency of feed use in beef cattle: A review. *Aust. J. Agric. Res.* 50:147–161.
- Arias, A., 1980. On the biology of gilthead seabream, *Sparus aurata* L. of estuaries in the rovince of Cadiz. *Inv. Pesq.* 40, 201-222.
- Astorga N. C., 2005. Estudio genético de las deformidades esqueléticas de columna en dorada (*Sparus aurata*, L.) en condiciones de cultivo intensivo. Ph.D. Thesis, University of Las Palmas de Gran Canaria, Spain.
- Astorga, N., Zamorano, M.J., Toro, M.A., García Cortés, L.A., Montero, D., Afonso, J.M., 2004. Heredabilidad del carácter presencia o ausencia de deformaciones esqueléticas en dorada (*Sparus aurata* L.). *ITEA*, 100A, 3, 256-250.
- Bardon A., Vandeputte, M., Dupont-Nivet, M., Chavanne, H., Haffray, P., Vergnet A., Chatain, B., 2009. What is the heritable component of spinal deformities in the European sea bass (*Dicentrarchus labrax*)? *Aquaculture*, 294, 194–201.
- Batargias, C., Dermitzakis, E., Magoulas, A., Zouros, E., 1999. Characterization of six polymorphic microsatellite markers in gilthead seabream, *Sparus aurata*. *Mol. Ecol.* 8, 897-898.
- Batargias, C.A., Fragoulis, S.B., Loukovitis, D.A., Tzokas, K.C., Koumoundouros G.B., 2015. Genetic parameters for the operculum and jaws deformities in larvae of gilthead sea bream (*Sparus aurata*). XII international symposium on genetics in aquaculture, Santiago de Compostela, Spain.
- Batargias, K., 1998. Genetics of gilthead seabream (*Sparus aurata*). Study of microsatellites and their use for the estimation of genetic parameters of growth and other quantitative characters. PhD Thesis, University of Crete, Greek.

## 5. REFERENCE

---

- Bentsen, HB., 1990. Application of breeding and selection theory on farmed fish. In, Hill, WG; Thompson, R and Woolliams, JA (Eds) Proceedings of the 4th World Congress on Genetics Applied to Livestock Production. 4th WCGALP, Edinburgh.
- Ben-Tuvia, A., 1979. Studies of the population and fisheries of *Sparus aurata* in the Bardawil Lagoon, eastern Mediterranean. *Inv. Pesq.* 43, 43-67.
- Blonk, R.J.W., Komen, J., Tenghe, A., Kamstra, A., van Arendonk, J.A.M., 2010. Heritability of shape in common sole, *Solea solea*, estimated from image analysis data. *Aquaculture*, 307, 6–11.
- Boglione, C., Gisbert, E., Gavaia, P., Witten, P.E., Moren, M., Fontagne, S., Koumoundouros, G., 2013. Skeletal anomalies in reared European fish larvae and juveniles. Part 2: main typologies, occurrences and causative factors. *Rev. Aquac.*, 5, pp. S121–S167.
- Bonin, A., Bellemain, E., Eidesen, P.B., Popanon, F., Brochmann, C., Taberlet, P., 2004. How to track and assess genotyping errors in population genetic studies. *Mol. Ecol.* 13, 3261-3273.
- Botstein, D., White, R.L., Skolnick, M., Davis, R.W., 1980. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *Am. J. Hum. Genet.* 32, 314- 331.
- Bowman, J. C., 1972. Genotype x environment interactions. *Annales de genetique et de selection animale*, 4 (1), pp.117-123.
- Brosnan, T., Sun, D-W., 2004. Improving quality inspection of food products by computer vision—a review. *Journal of Food Engineering* 61, 3–16.
- Brown, R.C., 2003. Genetic management and selective breeding of farmed populations of gilthead sea bream. Ph.D. Thesis, University of Stirling.
- Brown, R.C., Woolliams, J.A., MacAndrew, B.J., 2005. Factors influencing effective population size in commercial population of gilthead sea bream, *Sparus aurata*. *Aquaculture*, 247, 219-225.
- Brownie, J., Shawcross, S., Theaker, J., 1997. The elimination of primerdimer accumulation in PCR. *Nucleic Acids Res.* 25, 3235-3241.

## 5. REFERENCE

---

- Cañavate, P.J., Fernandez-Díaz, C., 2001. Pilot evaluation of freeze-dried microalgae in the mass rearing of gilthead sea bream *Sparus aurata* larvae. *Aquaculture* 193, 257-269.
- Cardellino, R., Rovira, J., 1987. Mejoramiento genético animal. Hemisferio Sur, Buenos Aires, 253 pp.
- Carleton, K.L., Streelman, J.T., Lee, B.Y., Garnhart, N., Kidd, M., Kocher, T.D., 2002. Rapid isolation of CA microsatellites from the tilapia genome. *Anim. Genet.* 33, 140-144.
- Castelló, F., 1993. Biology of teleost marine fish farming more interesting. In: *Marine Aquaculture: biological foundations and technology of production*. Castelló, F. Eds. University of Barcelona, Spain pp 61-67.
- Castro, J., Pino, A., Hermida, M., Bouza, C., Chavarrías, D., Merino, P., Sánchez, L., Martínez P., 2007. A microsatellite marker tool for parentage assessment in gilthead sea bream (*Sparus aurata*). En: M., Vandeputte, Chatain B., Hulata G. (Eds.), *Genetics in Aquaculture: Proceedings of the Ninth International Symposium*, 26-30 June 2006, Montpellier, France. *Aquaculture*, 272, Supplement 1, 210-216.
- Castro, J., 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 sea bream (*Sparus aurata*) supported by microsatellite family data. *Aquaculture* 279, 18–22.
- Cejas, J., Villamandos, J., Samper, M., 1992. Estudio sobre la reproducción de la dorada (*Sparus aurata*) en Canarias. Influencia del peso/edad de las hembras sobre la calidad de la puesta. *Inform. Tecnic.Inst. Esp. Ocean.* 126, 1-38.
- Chamberlain, J.S., Gibbs, R.A., Ranier, J.E., Nguyen, P.N., Caskey, C.T., 1988. Deletion screening of the Duchenne muscular dystrophy locus via multiplex DNA amplification. *Nucleic Acids Res.* 16, 11141-11156.
- Chavanne, H., Janssen, K., Hofherr, J., Contini, F., Haffray, P., Consortium, A., Komen, H., Nielsen, E.E., Bargelloni, L., 2016. A comprehensive survey on selective breeding programs and seed market in the European aquaculture fish industry. *Aquaculture International*. pp 1-21.

## 5. REFERENCE

---

- Chistiakov, D.A., Hellemans, B., Volckaert F.A.M., 2006. Microsatellites and their genomic distribution, evolution, function and applications: A review with special reference to fish genetics. *Aquaculture* 255, 1-29.
- Cnaani, A., Ron, M., Lee, B.Y., Hulata, G., Kocher, T.D., Seroussi, E., 2002. Mapping the transferrin gene in tilapia. *Anim. Genet.* 33, 78-80.
- CONAFE, 2012. <http://www.conafe.com/>.
- Costa, C., Antonucci, F., Pallottino, F., Aguzzi, J., Sun, D.W., Menesatti, P., 2011. Shape analysis of agricultural products: a review of recent research advances and potential application to computer vision. *Food Bioprocess Technol.* 4, 673–692.
- Costa, C., Vandeputte, M., Antonucci, F., Boglione, C., Costa, Menesatti, P., Cenadelli, S., Parati, K., Chavanne, H., Chatain, B., 2010. Genetic and environmental influences on shape variation in the European sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Biological Journal of the Linnean Society*, 101, 427–436.
- Crooijmans, R.P.M.A., Poel, JJ, Groenen, MAM, Bierbooms, VAF, Komen, J., 1997. Microsatellite markers in common carp (*Cyprinus carpio* L.). *Anim Genet.* 28, 129-134.
- Crow, JF., Denniston, C., 1988. Inbreeding and variance effective population numbers. *Evolution* 42, 482–495.
- De innocentis, S., Lesti, A., Livi, S., Rossi, A.r., Crosetti, D., Sola, L., 2004. Microsatellite markers reveal population structure in gilthead sea bream *Sparus aurata* from the Atlantic Ocean and Mediterranean Sea. *Fisheries Science* 70, 852-859.
- De innocentis, S., Miggiano, E., Ungaro, A., Livi, S., Sola, L., Crosetti, D., 2005. Geographical origin of individual breeders from gilthead sea bream (*Sparus aurata*) hatchery broodstocks inferred by microsatellite profiles. *Aquaculture* 247, 227-232.
- Doupé, R.G., Lymbery, A.J., 2005. Genetic covariation in production traits of sub-adult black bream *Acanthopagrus butcheri* after grow-out. *Aquaculture Research*, 36, 1128-1132.
- Du, C.J., Sun, D.W., 2004. Recent developments in the applications of image processing techniques for food quality evaluation. *Trends Food Sci. Technol.* 15, 230–249.
- Dunham, RA., Brummett, RE., 1999. Response of two generations of selection to increased body weight in channel catfish, *Ictalurus punctatus*, compared to hybridization with blue catfish, *I. furcatus*, males. *Journal of Applied Aquaculture* 9, 37-45.

## 5. REFERENCE

---

- 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.
- Ellegren, H., 2000. Microsatellite mutations in the germline: implications for evolutionary inference. *Trends Genet.* 16, 551-558.
- Falconer D.S., Mackay T.F.C., 1996. Introducción a la genética cuantitativa. Acribia, Zaragoza, pp. 469.
- FAO. 2015. [http://www.fao.org/fishery/culturedspecies/Sparus\\_aurata/en](http://www.fao.org/fishery/culturedspecies/Sparus_aurata/en).
- FEAP, 2008. The Federation of European Aquaculture Producers, production and price report of member associations of the F.E.A.P, 2001- 2008.
- Fernandes, T. F., Miguel, A. T., Jesús, F., Ania, P. Q., Miguel, H., Marine, H., Guillermo, B. D., María, D. L. B., Paulino, M., 2010. Estimación de parámetros genéticos para caracteres de crecimiento en Dorada (*Sparus aurata* L.). XV Reunión nacional de mejora genética animal, 16-18 junio, Vigo.
- Fernández-Palacios, H., 2005. Efecto de determinados nutrientes en la composición de dietas para reproductores de dorada (*sparus aurata*) sobre la calidad de sus puestas. Ph.D. Thesis, University of Las Palmas de Gran Canaria, Spain.
- Fessehayé, Y., El-Bialy, Z., Rezk, MA., Crooijmans, R., Bovenhuis, H., Komen, H., 2006. Mating systems and male reproductive success in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) in breeding hapas: a microsatellite analysis. *Aquaculture* 256, 148–158.
- Fishback, A.G., Danzmann, R.G., Ferguson, M.M., Gibson, J.P., 2002. Estimates of genetic parameters and genotype by environment interactions for growth traits of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) as inferred using molecular pedigrees. *Aquaculture* 206, 137–150.
- Flos, R., Reig, L., Oca, J., Ginovart, M., 2002. Influence of marketing and different land-based system on gilthead sea bream (*Sparus aurata*) quality. *Aquac. Int.* 10, 189-206.
- Frost, L. A., Brad S. Evans, Dean R. Jerry., 2006. Loss of genetic diversity due to hatchery culture practices in barramundi (*Lates calcarifer*). *Aquaculture* 261: 1056–1064.

## 5. REFERENCE

---

- Funes, V., Zuati, E., Catanese, G., Infante, C., Manchado, M., 2004. Isolation and characterization of ten microsatellite loci for Senegal sole (*Solea senegalensis* Kaup). *Molecular Ecology Notes*, 4, 339–341.
- Funkenstein, B., Cavari, B., Stadie, T., Davidovitch, E., 1990. Restriction site polymorphism of mitochondrial DNA of the gilthead sea bream (*Sparus aurata*) broodstock in Eilat, Israel. *Aquaculture* 89, 217-223.
- GAFRD, 2016. General Authority for Fish Resources Development. Egypt.
- Gall, GAE., Huang, N., 1988. Heritability and selection schemes for rainbow trout: body weight. *Aquaculture* 73, 43-56.
- García de León, F. J., M. Cannonne, E. Quillet, F. Bonhomme y B. Chatain., 1998. The application of microsatellite markers to breeding programmes in the sea bass, *Dicentrarchus labrax*. *Aquaculture* 159: 303-316.
- García-Celdrán, M., Ramis, G., Manchado, M., Estévez, A., Afonso, J.M., María-Dolores, E., Peñalver, J., Armero, E., 2015a. Estimates of heritabilities and genetic correlations of growth and external skeletal deformities at different ages in a reared gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.) population sourced from three broodstocks along the Spanish coasts. *Aquaculture* 445: 33–41.
- García-Celdrán, M., Ramis, G., Manchado, M., Estévez, Afonso, J.M., Armero, E., 2015c. Estimates of heritabilities and genetic correlations of carcass quality traits in a reared gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.) population sourced from three broodstocks along the Spanish coasts. *Aquaculture* 446; 175–180.
- García-Celdrán, M., Ramis, G., Manchado, M., Estévez, Navarro, A., Armero, E., 2015b. Estimates of heritabilities and genetic correlations of raw flesh quality traits in a reared gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.) population sourced from broodstocks along the Spanish coasts. *Aquaculture* 446; 181–186.
- García-Celdrán, M., Ramis, G., María-Dolores, E., Peñalver, J., Borrell, Y. J., Manchado, M., Estévez, A., Afonso, J.M., Armero, E., 2016. Genetic assessment of three gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.) populations along the Spanish coast and of three broodstocks managements. *Aquaculture International* (in press). DOI 10.1007/s10499-016-9998-8.

## 5. REFERENCE

---

- Ginés, R., 1997. Posibilidades de manipulación del fotoperíodo durante el engorde intensivo de dorada (*Sparus aurata*). PhD Thesis, University of las Palmas de gran canaria, Spain.
- Ginés, R., Afonso, J.M., Argüello, A., Zamorano, M.J., López J.L., 2004. The effects of long-day photoperiod on growth, body composition and skin colour in immature gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.). *Aquaculture Research*, 35, 1207-1212.
- Ginés, R., Afonso, J.M., Argüello, A., Zamorano, M.J., López, J.L., 2003. Growth in adult gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.) as a result of interference in sexual maturation by different photoperiod regimes. *Aquaculture Research*, 34, 73-83.
- Gjedrem, T., 1997. Flesh quality improvement in fish through breeding. *Aquaculture International*, 5, 197-206.
- Gjedrem, T., 2000. Genetic improvement of cold-water fish species. *Aquacult. Res.* 31, 25–34.
- Gjedrem, T., 2005. Selection and Breeding Programs in Aquaculture. Ed. Gjedrem, T., Springer, Dordrecht, The Netherlands. 364 pp.
- Gjedrem, T., J. Thodesen., 2005. Selection. In: Gjedrem (ed.), Selection and breeding programs in aquaculture. Springer, Heidelberg, Germany.
- Gjedrem, T., Robinson, N., Morten, R., 2012. The importance of selective breeding in aquaculture to meet future demands for animal protein: A review. *Aquaculture*, 350-353, 117-129.
- Gjerde, B., Gjedrem, T., 1984. Estimates of phenotypic and genetic parameters for carcass traits in Atlantic salmon and rainbow trout. *Aquaculture* 36, 97-110.
- Gjerde, B., Gjoen, HM., Villanueva, B., 1996. Optimum designs for fish breeding programmes with constrained inbreeding. Mass selection for a normally distributed trait. *Livest Prod Sci* 47, 59–72.
- Gjerde, B., Gunnes, K., Gjedrem, T., 1983. Effect of inbreeding on survival and growth in rainbow trout. *Aquaculture* 34, 327-332.
- Gjerde, B., Pante, M.J., Baeverfjord, G., 2005. Genetic variation for a vertebral deformity in Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Aquaculture*, 244, 77-87.
- Gjerde, B., Rye, M., 1998. Design of breeding programmes in aquaculture species: possibilities and constraints. In, Bartley, D and Basurco, B (Eds) Genetics and Breeding of Mediterranean Aquaculture Species. Proceedings of the Seminar of the CIHEAM

## 5. REFERENCE

---

- Network on Technology of Aquaculture in the Mediterranean (TECAM), April 1997, CIHEAM, Zaragoza, Spain. pp181-192. Cahier Options Mediterrennes, vol 34.
- 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.
- Gordin, H., Zohar, Y., 1978. Induced spawning of *Sparus aurata* (L.) by means of hormonal treatments. *Ann. Biol. Anim. Bioch. Biophys.* 18, 985-990.
- Gorshkov, S., Gordin, H., Gorshkova, G., Knibb, W., 1997. Reproductive constraints for family selection of the gilthead sea bream (*Sparus aurata*). *Israeli Journal of Aquaculture - Barmidgeh* 49, 124-134.
- Greenwood, P. H., Rosen, D. E., Weitzman, S. H. Myers, G.S., 1966. Phyletic studies of the teleostean fishes, with a provisional classification of living forms. *Bulletin American Museum Natural History* 131, 4:340-455.
- 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.
- Groeneveld, E., Kovač, M., Mielenz, N., 2010. VCE User's Guide and Reference Manual Version 6.0 (<ftp://ftp.tzv.fal.de/pub/vce6/doc/vce6-manual-3.1-A4.pdf>).
- Grundy, B., W. G. Hill., 1993. A method for reducing inbreeding with best linear unbiased prediction. *Anim. Prod.* 56:427.
- Gümüş, B., Balaban, M.Ö., Ünlüsayın, M., 2011. Machine Vision Applications to Aquatic Foods: A Review. *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 11: 171-181.
- Hashimoto, D.T., Mendonça, F.F., Senhorini, J.A., Bortolozzi, J., Oliveira, C., Foresti, F., Porto-Foresti, F., 2010. Identification of hybrids between Neotropical fish *Leporinus macrocephalus* and *Leporinus elongatus* by PCR-RFLP and multiplex-PCR: Tools for genetic monitoring in aquaculture. *Aquaculture* 298, 346-349.
- Hashimoto, D.T., Parise-Maltempi, P.P., Laudicina, A., Bortolozzi, J., Senhorini, J.A., Foresti, F., Porto-Foresti, F., 2009. Repetitive DNA probe linked to sex chromosomes in hybrids between Neotropical fish *Leporinus macrocephalus* and *Leporinus elongatus* (*Characiformes, Anostomidae*). *Cytogenet. Genome Res.* 124, 151–157.

## 5. REFERENCE

---

- Hely, F. S., Amer, P. R., Walker, S. P., Symonds, J. E., 2013. Optimised parent selection and minimum inbreeding mating in small aquaculture breeding schemes: a simulation study. *Animal*, 7:1, pp 1–10.
- Henryon, M., Sørensen, AC., Berg, P., 2009. Mating animals by minimising the covariance between ancestral contributions generates less inbreeding without compromising genetic gain in breeding schemes with truncation selection. *Animal*, 3:1339-1346.
- Herbinger, C., O'Reilly, P., Doyle, R., Wright, J., Flynn, F., 1999. Early growth performance of Atlantic salmon full-sib families reared in single family tanks versus in mixed family tanks. *Aquaculture*, 173, 105-116.
- Herbinger, CM., Newkirk, GF., 1990. Sources of family variability for maturation incidence in cultivated Atlantic salmon. *Aquaculture* 85, 153-162.
- Hulata G., Wohlfart G.W., Halevy., 1986. Mass selection for growth rate in the Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Aquaculture* 57:177-184.
- Iwamoto, R.N., Myers, J.M., Hershberger, W.K., 1990. Heritability and genetic correlations for flesh coloration in pen-reared coho salmon. *Aquaculture* 86, 181-190.
- Janssen. K., Chavanne H., Berentsen P., Komen H., 2016. Impact of selective breeding on European aquaculture. *Aquaculture* (in press).
- Jorstad, KE., Naevdal, G., 1996. Breeding and Genetics. In, Penner, W and Barton, BA (Eds) *Principles of Salmonid Culture. Developments in Aquaculture and Fisheries Science*, vol 29, pp.665-725. Elsevier, Amsterdam.
- Jover, M., 2007. Alternativas de futuro para la producción de la dorada (*Sparus aurata*). XI Congreso Nacional de Acuicultura, Vigo, 1337-1342.
- Kause, A., D. Tobin, D. F. Houlihan, S. A. M. Martin, E. A. Mäntysaari, O. Ritola, and K. Ruohonen., 2006. Feed efficiency of rainbow trout can be improved through selection: Different genetic potential on alternative diets. *J. Anim. Sci.* 84:807–817.
- 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., Ritola, O., Paananen, T., Eskelinen, U., Mäntysaari, E., 2003. Big and beautiful? Quantitative genetic parameters for appearance of large rainbow trout. *J. Fish Biol.* 62, 610–622.

## 5. REFERENCE

---

- 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., Ritola, O., Paananen, T., Wahlroos, H., Mäntysaari, E.A., 2005. Genetic trends in growth, sexual maturity and skeletal deformations, and rate of inbreeding in a breeding programme for rainbow trout. *Aquaculture*, 247, 177–187.
- Kettunen, A., Fjalestad, K.T., 2007. Genetic parameters for important traits in the breeding program for Atlantic cod (*Gadus morhua* L.). *Aquaculture* 272 (Supplement 1), S276.
- Kinghorn, B., 1983. Genetic variation in food conversion efficiency and growth in rainbow trout. *Aquaculture* 32: 141–155.
- Kirpichnikov, V.S., 1981. *Genetic Basis of Fish Selection*. Springer Verlag, Berlin.
- Knibb, W. R., 2000. Genetic improvement of marine fish- which method for industry? *Aquaculture*, 31: 11-23.
- Knibb, W., Gorshkova, G., Gorshkov, S., 1998. Selection and crossbreeding in Mediterranean cultured marine fish (Review). *Cahiers Options Méditerranéennes*, 34, 47-60.
- Knibb, W.R., Gorshkova, G., Gorshkov, S., 1997. Selection for growth in the gilthead sea bream (*Sparus aurata*). *The Israeli Journal of Aquaculture-Bamidghe*, 49, 57-66.
- Knight, B., 1985. Feeding behaviour and fish culture. En "Nutrition and feeding in fish" (C.B. Cowey, A.M. Mackie y J.G. Bell, eds.), Academic Press, Londres, 1985, pp. 223-241.
- Kocour, M., Linhart, O., Vandeputte, M., 2006. Mouth and fin deformities in common carp: is there a genetic basis?. *Aquaculture Research* 37, 419–22.
- Kocour, M., Mauger, S., Rodina, M., Gela, D., Linhart, O., Vandeputte, M., 2007. Heritability estimates for processing and quality traits in common carp (*Cyprinus carpio* L.) using a molecular pedigree. *Aquaculture*, 270, 43–50.
- Kohlmann, K., Gross, R., Murakaeva, A., Kersten, P., 2003. Genetic variability and structure of common carp (*Cyprinus carpio*) populations throughout the distribution range inferred from allozyme, microsatellite and mitochondrial DNA markers. *Aquat Living Resour* 16, 421-431.

## 5. REFERENCE

---

- 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.
- Lal, K.K., Chauhan, T, Mandal, A., Singh, R.K., Khulbe, L., Ponniah, A.G., Mohindra V., 2004. Identification of microsatellite DNA markers for population structure analysis in Indian major carp, *Cirrhinus mrigala* (*Hamilton Buchanan*, 1882). *J Appl Ichthyol* 20, 87-91.
- Launey, S., Krieg, F., Haffray, P., Bruant, J.S., Vanniers, A., Guyomard, R., 2003. Twelve new microsatellite markers for gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.): characterization, polymorphism and linkage. *Mol. Ecol.* 3, 457-459.
- Lee, W.J., Kocher, T.D., 1998. Microsatellite mapping of prolactin locus in tilapia genome. *Amin. Genet.* 29, 68-69.
- Lee-Montero, 2012. Desarrollo de un programa piloto a nivel nacional de mejora genética en dorada (*Sparus aurata* L.): estimación de parámetros genéticos de caracteres de crecimiento y calidad e interacción genotipo ambiente. PhD Thesis, University of las Palmas de gran canaria, Spain.
- Lee-Montero, A. Navarro, D. Negrin-Baez, M. J. Zamorano, C. Berbel, J. A. Sanchez, M. Garcia-Celdran, M. Manchado, A. Estevez, E. Armero, J. M. Afonso., 2015. Genetic parameters and genotype–environment interactions for skeleton deformities and growth traits at different ages on gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.) in four Spanish regions. *Animal Genetics* 46, 164–174.
- Lee-Montero, A. Navarro, Y. Borrell, M. Garcia-Celdra'n, N. Martín, D. Negrin-Baez, G. Blanco, E. Armero, C. Berbel, M. J. Zamorano, J. J. Sanchez, A. Este'vez, G. Ramis, M. Manchado, J. M. Afonso., 2013. Development of the first standardised panel of two new microsatellite multiplex PCRs for gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.). *animal genetics*, 44, 533–546.
- Li, D., Kang, D., Yin, Q., Sun, X., Liang, L., 2007. Microsatellite DNA Marker Analysis of Genetic Diversity in Wild Common Carp (*Cyprinus carpio* L.) Populations. *Genetics and Genomics* 34, 984-993.
- Liang, L.Q., Sun, X.W., 2003. Mapping cold tolerance strain on genetic linkage map of common carp. *J Dalian Fish Univ*, 18, 278-281. (In Chinese with an English abstract).

## 5. REFERENCE

---

- Litt, M., Luty, J.A., 1989. A hypervariable microsatellite revealed by in vitro amplification of dinucleotide repeat within the cardiac muscle actin gene. *Am. J. Hum. Genet.* 44, 397-401.
- Liu, Z., Li, P., Kocabas, A., Karsi, A., Ju, Z., 2001. Microsatellite containing genes from the channel catfish brain: evidence of trinucleotide repeat expansion in the coding region of nucleotide excision repair gene RAD23B. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 289, 317-324.
- Liu, Z., Tan, G., Li, P., Dunham, R.A., 1999. Transcribed dinucleotide microsatellites and their associated genes from channel catfish *Ictalurus punctatus*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 259, 190-194.
- Liu, Z.J., Cordes, J.F., 2004. DNA marker technologies and their applications in aquaculture genetics. *Aquaculture* 238, 1-37.
- López-Fanjul C., Toro, M.A., 2007. Fundamentos de la mejora genética en acuicultura. En: Martínez, P., Figueras, A. (Eds.), *Genética y genómica en acuicultura*. Madrid, pp. 155-182.
- Lumare, F., Villani, P., 1973. Matuita sessuale indotta e feconfazione artificial in *Sparus aurata* (L.). *Inv. Pesq.* 37, 57-71.
- Luna, L., Fernández, J., Incera, M.T., Duque, D, Fernández, J., García, R., Fernández, C., 2006. La demanda de filete de dorada en el mercado Español. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. ISBN: 84-491-0707-5.
- Lythage, J.N., Lythage, G., 1992. *Fishes of the sea: the North Atlantic and Mediterranean*. The MIT Press, Cumberland, Rhode Island, U.S.A. pp 113-114.
- Magoulas, A., 1999. Application of molecular markers to aquaculture and broodstock management with special emphasis on microsatellite DNA. *Cahiers Options Mediterrannes* 34, 153-168.
- Markoulatos, P., Siafakas, N., Moncany, M., 2002. Multiplex Polymerase Chain Reaction: A Practical Approach. *Clinical Laboratory Analysis* 16, 47-51.
- McKay, LR., Ihssen, PE., Friars, GW., 1986. Genetic parameters of growth in rainbow trout, *Salmo gairdneri*, as a function of age and maturity. *Aquaculture* 58, 241-254.

## 5. REFERENCE

---

- McPhee, C.P., Brennan, P.J., Cuncalfe., F., 1979. Genetic and phenotypic parameters of Australian Large White and Landrace boars performance tested when offered fed *ad libitum*. *Animal Production*, 28, 79.
- Meuwissen, T.H.E., 1997. Maximizing the response of selection with a predefined rate of inbreeding. *J. Anim. Sci.* 75:934-940.
- Meuwissen, T.H.E., Woolliams, J.A., 1994. Effective sizes of livestock populations to prevent a decline in fitness. *Theoretical Applied Genetics* 89, 1019-1026.
- Montero, D., Robaina, L., Tort, L., Afonso, J.M., Fernández-Palacios, H., Izquierdo, M.S., 2001. Selective breeding for stress tolerance in gilthead sea bream *Sparus aurata*. *Aquaculture*, 21–25 January Orlando, Florida, USA.
- Moretti, A., Pedini, M.F.C., Citolin, G., Guidastri, R., 1999. Manual on hatchery production of Seabass and Gilthead sea bream. Vol 1. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Roma.
- Naish, K.A., Park, L.K., 2002. Linkage relationships for 35 new microsatellite loci in chinook salmon *Oncorhynchus tshawytscha*. *Anim. Genet.* 33, 218-316.
- Nathan, A. J., Caird, E.R., Eric, M.H., Roger, L.V., Yniv, P., 2007. Development and evaluation of a new microsatellite multiplex system for parental allocation and management of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) broodstocks. *Aquaculture* 266, 53–62.
- 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 sea bream (*Sparus auratus* L.), red porgy (*Pagrus pagrus* L.) and redbanded seabream (*P. auriga*, Valenciennes, 1843) and their application to paternity studies. *Aquaculture* 285, 30-37.
- Navarro, A., Lee-Montero, I., Santana, D., Henríquez, P., Ferrer, M.A., Morales, A., Soula, M., Badilla, R., Negrín-Báez, D., Zamorano, M.J., Afonso, J.M., 2016. IMAFISH\_ML: A fully-automated image analysis software for assessing fish morphometric traits on gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.), meagre (*Argyrosomus regius*) and red porgy (*Pagrus pagrus*). *Computers and Electronics in Agriculture*, 121,66–73.

## 5. REFERENCE

---

- Navarro, A., Oliva, V., Zamorano, M.J., Gines, R., Izquierdo, M.S., Astorga, N., Afonso, J.M., 2006. Evaluation of PIT system as a method to tag fingerling of gilthead sea bream (*Sparus auratus* L.): effects on growth, mortality and tag loss. *Aquaculture*, 257, 309-315.
- Navarro, A., Zamorano, M.J., Hildebrandt, S., Ginés, R., Aguilera, C., Afonso, J.M., 2009a. Estimates of heritabilities and genetic correlations for growth and carcass traits in gilthead seabream (*Sparus auratus* L.), under industrial conditions. *Aquaculture*, 289, 225-230.
- Navarro, A., Zamorano, M.J., Hildebrandt, S., Ginés, R., Aguilera, C., Afonso, J.M., 2009b. Estimates of heritabilities and genetic correlations for body composition traits and G×E interactions, in gilthead sea bream (*Sparus auratus* L.) *Aquaculture*, 295, 183–187.
- Neff, B.D., Fu, P., Gross, M.R., 2000. Microsatellite multiplexing in fish. *Transactions of the American Fisheries Society* 129, 584-593.
- Negrin-Baez, D, Navarro, A., Lee-Montero, I., Afonso, J.M., Sanchez, J.J., Elalfy, I.S., Manchado, M., Sanchez, J.A., Garcia-Celdran, M., Zamorano, M.J. 2015. A set of 13 multiplex PCRs of specific microsatellite markers as a tool for QTL detection in gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.). *Aquaculture Research*, 46 (1), 45–58.
- Neira, R., 2010. Breeding in aquaculture species: genetic improvement programs in developing countries. 9th World Congress on Genetics Applied to Livestock Production, Leipzig, Germany, August 1–6, p. 8.
- Neira, R., Lhorente, J.P., Araneda, C., Díaz, N., Bustos, E., Alert, A., 2004. Studies on carcass quality traits in two populations of Coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*): phenotypic and genetic parameters. *Aquaculture*, 241, 117–131.
- Neumaier, A., Groeneveld, E., 1998. Restricted maximum likelihood estimation of covariances in sparse linear models. *Genetics selection evolution*, 1(30), 3–26.
- Nielsen, D., Hyldig, G., Nielsen, J., Nielsen, H.H., 2005. Lipid content in herring (*Clupea harengus* L.) influence of biological factors and comparison of different methods of analyses: solvent extraction, Fatmeter, NIR and NMR. *LWT* 38 (2005) 537–548.

## 5. REFERENCE

---

- Nirea, K. G., Sonesson, A.K., Woolliams, J.A., Meuwissen, T. H., 2012. Effect of non-random mating on genomic and BLUP selection schemes. *Genetics Selection Evolution*, 44:11.
- Olesen, I., Gjedrem, T., Bentsen, H.B., Gjerde, B., Rye, M., 2003. Breeding programs for sustainable aquaculture. *Journal of Applied Aquaculture*, 13, 179-204.
- Oliva, V. 2007. Análisis de variabilidad genética mediante marcadores microsatélites y de la expresión del gen Delta 6 desaturasa, en poblaciones de dorada (*Sparus aurata*). PhD Thesis, University of Las Palmas de Gran Canaria, Spain.
- Oliva, V., Zamorano, M.J., Astorga, N., Ginés, R., Navarro, A., Cavari, B., Funkenstein, B., Afonso, J.M., 2005. Microsatellite diversity in natural populations of *Sparus aurata* using interspecific and intraspecific markers. In: Neira, R., Diaz, N. (Eds.), *Genetics in Aquaculture VIII. Proceedings of the Eighth International Symposium*, 9–15 November 2003, Puerto Varas, Chile. *Aquaculture* 247, p. 27.
- 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.
- Palti, Y., Shirak, A., Cnaani, A., Feldmesser, E., Avtalion, R.R., Hulata, G., Ron, M., 2001. A microsatellite locus has more than one copy in the genome of two tilapia species (*Oreochromis aureus* and *O. niloticus*). *Anim. Genet.* 32, 40-41.
- Pante, M., Gjerde, B., McMillan, I., 2001. Inbreeding levels in selected populations of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Aquaculture* 192, 213–224.
- Pérez-Enciso, M., Toro, M. Á., 2007. Localización de genes y selección mediante marcadores moleculares. En: *Genética y genómica en acuicultura*. Coord., Martínez, P., Figueras, A. Ed. Publicaciones Científicas y Tecnológicas de la Fundación Observatorio Español de Acuicultura, Madrid, p. 361-400. ISBN, 978-84-00-085537, 890 pp.
- Piñera J.A., 2009. Técnicas moleculares en la mejora genética de especies de interés en la acuicultura española. Doctoral thesis. Department of Functional Biology, University of Oviedo, Asturias, Spain.
- Piñera, J.A., Bernardo, D., Blanco, G., Vázquez, E., Sánchez, J.A., 2006. Isolation and characterization of polymorphic microsatellite markers in *Pagellus bogaraveo*, and

## 5. REFERENCE

---

- cross-species amplification in *Sparus aurata* and *Dicentrarchus labrax*. Mol. Ecol. Notes 6, 33-35.
- Ponce, M., Infante, C., Crespo, A., Zuasti, E., Pérez, L., Funes, V., Catanese, G., Cárdenas, S., Manchado, M., 2006. Characterization of microsatellite loci for the redbanded reabream, *Pagrus auriga* (*Teleostei Sparidae*). Mol. Ecol. Notes 6, 527-529.
- Ponzoni, R.W., Nguyen, N.H., Khaw, H.L., 2007. Investment appraisal of genetic improvement programs in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). Aquaculture, 269, 187–199.
- Ponzoni, R.W., Nguyen, N.H., Khaw, H.L., Ninh, N.H., 2008. Accounting for genotype by environment interaction in economic appraisal of genetic improvement programs in common carp *Cyprinus carpio*. Aquaculture, 285, 47–55.
- Porta, J., Porta, J.M., Béjar, J., Álvarez, M.C., 2010. Development of a microsatellite multiplex genotyping tool for the fish Gilthead sea bream (*Sparus aurata*): applicability in population genetics and pedigree analysis. Aquaculture Research, 41,10 1514-1522.
- Powell, J., White, I., Guy, D., Brotherstone, S., 2008. Genetic parameters of production traits in Atlantic salmon (*Salmo salar*). Aquaculture, 274, 225–231.
- Pym, R. A. E., 1990. Nutritional Genetics. Pages 847–876 in Poultry Breeding and Genetics. R. D. Crawford, ed. Elsevier, Oxford, UK.
- Quinton, C.D., Kause, A., Ruohonen, K., Koskela, J., 2007. Genetic relationships of body composition and feed utilization traits in European whitefish (*Coregonus lavaretus* L.) and implications for selective breeding in fishmeal- and soybean meal-based diet environments. J Anim Sci, 85, 3198-3208.
- Ramšak, A., Garoia, F., Guarniero, I., Mannini, P., Tinti, F., 2003. Novel polymorphic microsatellite markers for the common Pandora (*Pagellus erythrinus*). Mol. Ecol. Notes 3, 553-555.
- 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.

## 5. REFERENCE

---

- Rexroad, C.E., Coleman, R.L., Hershberger, W.K., Killefer, J., 2002a. Thirty-eight polymorphic microsatellite markers for mapping in rainbow trout. *J. Anim. Sci.* 80, 541-542.
- Rexroad, C.E., Coleman, R.L., Hershberger, W.K., Killefer, J., 2002b. Eighteen polymorphic microsatellite markers for rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Anim. Genet.* 33, 76-78.
- Rexroad, C.E., Coleman, R.L., Martin, A.M., Hershberger, W.K., Killefer, J., 2001. Thirty-five polymorphic microsatellite markers for rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Anim. Genet.* 32, 317-319.
- Robaina, L., Fernández, A., Vergara, J.M., Izquierdo, M.S., Montero, D., Gimferrer, E., 1997. Efecto de la frecuencia de alimentación sobre el crecimiento, la utilización del alimento y la composición lipídica del músculo de dorada (*Sparus aurata*). VI National Congress of Aquaculture, 9-11 July, Cartagena, Spain.
- Roo, F.J., Hernández-Cruz, C. M., Socorro, J. A., Fernández- Palacios, H., Montero, D., Izquierdo, M. S., 2009. Effect of DHA content in rotifers on the occurrence of skeletal deformities in red porgy *Pagrus pagrus* (Linnaeus, 1758). *Aquaculture*, 287, 84–93.
- Rowena, M., Romana, R.E., Ikedab, M., Basiaoa, Z.U., Taniguchi, N., 2004. Genetic diversity in farmed Asian Nile and red hybrid tilapia stocks evaluated from microsatellite and mitochondrial DNA analysis. *Aquaculture* 236, 131-150.
- Rutten, M.J.M., Bovenhui, H., Komen, H., 2004. Modeling fillet traits based on body measurements in three Nile tilapia strains (*Oreochromis niloticus* L.). *Aquaculture*, v.231, pp. 113-122.
- Rutten, M.J.M., Bovenhuis, H., Komen, H., 2005. Genetic parameters for fillet traits and body measurements in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus* L.). *Aquaculture*, 246, 125–132.
- Rye, M., Gjerde, B., Gjedrem, T., 2010. Genetic development programs for aquaculture species in developed countries. 9th World Congress on Genetics Applied to Livestock production, Leipzig, Germany, August 1–6, p. 8.
- Sae-Lim, P., Kause, A., Mulder, HA., Martin, KE., Barfoot, AJ., Parsons, J., 2013. Genotype-by-environment interaction of growth traits in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): A continental scale study. *J Anim Sci* 91: 5572–5581.

## 5. REFERENCE

---

- Saillant, E., Dupont-Nivet, M., Haffray, P., Chatain, B., 2006. Estimates of heritability and genotype–environment interactions for body weight in sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) raised under communal rearing conditions. *Aquaculture* 254, 139–147.
- Saillant, E., Ma, L., Wang, X., Gatlin, D.M., Gold, J.R., 2007. Heritability of juvenile growth traits in red drum (*Sciaenops ocellatus* L.). *Aquacult. Res.* 38, 781–788.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T., 1989. *Molecular Cloning. A laboratory manual*. 2nd edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, N.Y.
- Senger, E., Priat, C., Hitte, C., Sarropoulou, E., Franch, R., Geisler, R., Bargelloni, L., Power, D., Galibert, F., 2006. The first radiation hybrid map of a perch-like fish: the gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.). *Genomics* 87, 793–800.
- Serapion, J., Kucuktas, H., Feng, J., Liu, Z., 2004. Bioinformatic mining of type I microsatellites from expressed sequence tags of channel catfish (*Ictalurus punctatus*). *Mar. Biotechnol.* 6, 364-377.
- Shields, R.J., 2001. Larviculture of marine finfish in Europe. *Aquaculture* 227, 439- 458.
- Silva, F.V., Sarmiento, N.L.A.F., Viera, J.S., 2009. Características morfométricas, rendimentos de carcaça, filé, vísceras e resíduos em tilápias-do-nilo em diferentes faixas de peso. *Revista Brasileira de Zootecnia*, v.38, n.8, pp. 1407-1412.
- Simm, G., 1998. *Genetic improvement of cattle and sheep*. Ed. Geoff Simm. Ipswich: Farming Press.
- Skaala, A., Høyheim, B., Glover, D.G., 2004. Microsatellite analysis in domesticated and wild Atlantic salmon (*Salmo salar* L.): allelic diversity and identification of individuals. *Aquaculture* 240, 131-143.
- Sletten, A., Olsaker, I., Lie, O., 1997. Segregation studies and linkage analysis of Atlantic salmon microsatellites using haploid genetics. *Heredity* 78, 620-627.
- Sonesson, A. K., Nielsen, H. M., 2012. Quantifying the effects of reproduction results on genetic gain and rates of inbreeding in mass spawning breeding schemes. *World Aquaculture Society: AQUA*, September 1-5, Prague, Czech Republic.
- Sonesson, A., John, A., Woolliams, J. A., Meuwissen, T. H., 2012. Genomic selection requires genomic control of inbreeding. *Genetics Selection Evolution*, 44:27.

## 5. REFERENCE

---

- Sonesson, A.K., Meuwissen, T.H.E., 2000. Mating schemes for optimum contribution selection with constrained rates of inbreeding. *Genet Sel Evol*, 32:231-248.
- Soula, M., 2012. Estimación de parámetros genéticos en corvina, *Argyrosomus regius*, para caracteres de crecimiento, rendimiento y calidad de la carne y del pez. PhD Thesis, University of las Palmas de Gran Canaria, Spain.
- Souza, A.F.L., 2008. Rendimento, composição química e perfil de minerais das principais espécies de peixes comercializadas no estado do Amazonas. 132f. Dissertação (Mestrado em Ciências Agrárias) Universidade Federal do Amazonas, Manaus.
- Standal, M., Gjerde, B., 1987. Genetic variation in survival of Atlantic salmon during the sea rearing-period. *Aquaculture* 66, 197–207.
- Stockley, B.M., Rogers, A.D., Iyengar, A., Menezes, G., Santos, R., Long, A., 2000. Ten microsatellite loci isolated and developed for the blackspot seabream, *Pagellus bogaraveo* (Brunnich 1768). *Mol. Ecol.* 9, 999-1000.
- Streelman, J.T., Kocher, T.D., 2002. Microsatellite variation associated with prolactin expression and growth of salt-challenged tilapia. *Physiol. Genomics* 9, 1-4.
- Suau, P., Lopez, J., 1976. Contribution to the studio of the gilthead sea bream, *Sparus aurata* L. *Inv. Pesq.* 40, 160-199.
- Sun, X.W., Liang, L.Q., 2004. A genetic linkage map of common carp (*Cyprinus carpio* L.) and mapping of a locus associated with cold tolerance. *Aquaculture* 238, 165-172.
- Takagi, M., Taniguchi, N., Cook, D., Doyle, R.W., 1997. Isolation and characterization of microsatellite loci from red sea bream *Pagrus major* and detection in closely related species. *Fish. Sci.* 63, 199-204.
- Tanck, M.W., Palstra, A.P., van der Weerd, M., Leffering, C.P., van der Poel, J.J., Bovenhuis, H., Komen, J., 2001. Segregation of microsatellite alleles and residual heterozygosity at single loci in homozygous androgenetic common carp (*Cyprinus carpio* L.). *Genome* 44, 743-751.
- Tautz, D., 1989. Hypervariability of simple sequences as a general source for polymorphic DNA markers. *Nucleic Acids Res.* 17, 6463-6471.

## 5. REFERENCE

---

- Tautz, D., Renz, M., 1984. Simple sequences are ubiquitous repetitive components of eukaryote genomes. *Nucleic Acids Res.* 17, 4127-4138.
- Tave, D., 1986. *Genetics for Fish Hatchery Managers*. AVI Publishing Company, Inc., Westport, Connecticut, p. 299.
- Tave, D., 1993. *Genetics for fish hatchery managers (2nd Ed)*. Kluwer Academic Publishers, Boston
- Tave, D., 1995. *Selection Schemes in Medium Sized Fish Farms*. FAO Technical Series 352, Rome.
- Teichert-Coddington, DR., Smitherman, RO., 1988. Lack of response by tilapia to mass selection for rapid early growth. *Transactions of the American Fisheries Society* 117, 297-300.
- Thorland I., Papaioannou, N., Kottaras, L., Refstie, T., Papisolomontos, S., Rye, M., 2006. Family based selection for production traits in gilthead sea bream (*Sparus aurata*) and European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) in Greece. *Genetics in Aquaculture IX*, p104 (presentación oral). Montpellier, France.
- Thorland, I., Kottaras, L., Refstie T., Dimitroglou, A., Papaharisis L., Rye M., 2015. Response to selection for harvest weight in a family based selection program of gilthead sea bream (*Sparus aurata*). XII international symposium on genetics in aquaculture, Santiago de Compostela, Spain.
- Toth, G., Gaspari, Z., Jurka, J., 2000. Microsatellites in different eukaryotic genomes: survey and analysis. *Genome Res.* 10, 967-981.
- Vandeputte, M., Kocour, M., Mauger, S., Dupont-Nivet, M., De Guerry, D., Rodina, M., Gela, D., Vallod, D., Chevassus, B., Linhart, O., 2004. Heritability estimates for growth-related traits using microsatellite parentage assignment in juvenile common carp (*Cyprinus carpio* L.). *Aquaculture* 235, 223-236.
- Vandeputte, M., 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.

## 5. REFERENCE

---

- Villanueva, B., Wooliams, J.A., Gjerde, B., 1996. Optimum designs for breeding programmes under mass selection with an application in fish breeding. *Anim Sci* 63, 563–576.
- Vos, P., Hogers, R., Bleeker, M., Reijans, M., van de Lee, T., Hornes, M., Frijters, A., Pot, J., Pelemant, J., Kuiper, M., Zabeay, M., 1995. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Res.* 23, 4407-4414.
- Welsh, J., McClelland, M., 1990. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucleic Acids Res.* 18, 7213-7218.
- Wesmajervi, M.S., Westgaard, J.I., Delghandi, M., 2006. Evaluation of a novel pentaplex microsatellite marker system for paternity studies in Atlantic cod (*Gadus morhua* L.). *Aquacult. Res.* 37, 1195-1201.
- Williamson, K.S., Cordes, J.F., May, B., 2001. Characterization of microsatellite loci in Chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*) and cross-species amplification in other salmonids. *Mol. Ecol. Notes* 2, 17-19.
- Wilson, F.I., Bourke, E.A., Cross, T.F., 1995. Genetic variation at traditional and novel allozyme loci, applied to interactions between wild and reared *salmo salar* L. Atlantic salmon. *Heredity* 75, 578-588.
- Wohlfarth, G.W., Moav, R., 1985. Communal testing, a method of testing the growth of different genetic groups of common carp in earthen ponds. *Aquaculture* 48, 143-157.
- Yue, G.H., Ho, M.Y., Orban, L., Komen, J., 2004. Microsatellites within genes and ESTs of common carp and their applicability in silver crucian carp. *Aquaculture* 234, 85-98.
- Zohar, Y., Mylonas, C.C., 2001. Endocrine manipulations of spawning in cultured fish: from hormones to genes. *Aquaculture* 197, 99-136.

**ANEXO**  
**RESUMEN EN ESPAÑOL**



**Resumen**

La dorada (*Sparus aurata* L.), es una de las especies más importantes de la acuicultura Mediterránea. En el último quinquenio, la implementación de programas de mejora genética ha atraído la atención de productores al objeto de contribuir al crecimiento sostenible y competitivo de las empresas. La implementación de programas de mejora genética en dorada introduce costes a través de la racionalización de la producción, a la vez que muestra poco progreso a corto plazo, pero sin embargo es sabido que se trata de una herramienta que tiene beneficios continuos, acumulativos y permanentes para la industria. El principal objetivo del presente estudio ha sido estudiar la segunda generación del programa de mejora genética PROGENS A<sup>®</sup>, para implementar y estudiar caracteres tecnológicos no invasivos (KET's), y diferentes modelos de gestión de reproductores que permitan mejorar la contribución familiar. Se estudian las correlaciones genéticas entre las KET's y caracteres biológicos de interés comercial, bajo condiciones industriales de cultivo, con el fin de identificar metodologías nuevas para la evaluación genética masiva, preciso y económica de animales. Las interacciones Genotipo-Ambiente son consideradas para los caracteres KET's y caracteres biológicos, en dos sistemas de cultivo: jaulas y esteros.

Se han estudiado tres diferentes modelos de puesta masal, de acuerdo con el número de días de puesta. Un día (a pequeña escala 1DS, y a gran escala 1DL), dos días (2DL) y cuatro días (4DL) consecutivos bajo condiciones industriales, con el fin de optimizar la estructura de cría de manera factorial. Todas las puestas fueron cultivadas de manera similar utilizando diferente número de reproductores y proporción de sexos. En el muestreo, se estimaron valores de crecimiento mediante el peso, la longitud, el factor de condición y la tasa específica de crecimiento. Los genotipos y la matriz de parentesco fueron estimados mediante el uso de marcadores microsatélites en reacciones múltiples de PCR, interespecíficas (RimA) y específicas (SMsa1).

En el modelo 1DS, se constituyeron tres lotes de reproductores independientes, de cada uno de los cuales se obtuvo un puesta. En total, se utilizaron 18 reproductores entre los tres lotes (6 reproductores por cada uno), de los cuales 17 contribuyeron a alguna de las puestas masales (94%), para producir un total de 21 familias de hermanos completos y 16 familias de medios hermanos (maternas y paternas). En el modelo 1DL, compuesto por 66 reproductores, sólo 28 peces (42%), 17 hembras y 11 machos, contribuyeron a la puesta. Se

## RESUMEN ESPAÑOL

---

produjo un total de 89 familias de hermanos completos de las que 24 fueron de medios hermanos (8 paternas y 16 maternas). En el modelo 2DL, contribuyeron 139 reproductores (67%), y se establecieron 297 familias de hermanos completos y 105 de medios hermanos (52 paternas y 53 maternas). En el modelo 4DL, constituido por 123 reproductores, 83 peces (67%), 40 hembras y 43 machos, contribuyeron a producir un total de 201 familias de hermanos completos, de las que 59 fueron de medios hermanos (32 paternas y 27 maternas).

Se estudió la existencia de variabilidad genética aditiva en caracteres biológicos y sus equivalentes desarrollados mediante tecnologías de ingeniería o caracteres tecnológicos, así como sus correlaciones genéticas con otros caracteres de crecimiento, rendimiento, carcasa y calidad de la carne, a través de poblaciones de descendientes provenientes de reproductores establecidos en dos centros de investigación (PCTM en las Islas Canarias, IFAPA en Andalucía). Estos pertenecen a la segunda generación del programa de mejora genética PROGENSA (denominada INNOTECCS), y fueron marcados individualmente mediante PIT, y remitidos a ambos centros de investigación y empresas del sector (ADSA y PIMSA). A la talla de sacrificio, los peces fueron muestreados para crecimiento, carcasa, calidad de la carne y los caracteres tecnológicos, estos últimos mediante el programa IMAFISH. Muestras de las aletas caudales de los peces fueron cogidas y conservadas en etanol para los análisis de pedigrí. El genotipado y la asignación de parentesco fueron inferidos mediante la caracterización genética de todos los reproductores y los descendientes, usando la múltiple de PCR SMsa-1 (Super Múltiple *Sparus aurata*), conteniendo 11 marcadores microsatélites específicos. Se estimaron los parámetros genéticos (heredabilidad y correlación genética y fenotípica) para caracteres de crecimiento, rendimiento, calidad de la carne y la morfología. A la talla de sacrificio, se estudió también la interacción genotipo-ambiente (GxE), entre los dos sistemas de engorde (ADSA, jaula; PIMSA, estero).

Las heredabilidades estimadas oscilaron entre 0,09 y 0,25 para el crecimiento, 0,04 y 0,35 para la carcasa, 0,08 y 0,27 para la composición corporal y 0,04 y 0,40 para los caracteres tecnológicos, que fueron las estimas más altas. Las estimas de las correlaciones genéticas para los caracteres de crecimiento fueron principalmente medias y altas, siendo medias para la carcasa. Para la composición corporal, fueron negativas y altas para la humedad frente al contenido en lípidos, negativa y baja para el contenido en proteínas y la humedad o lípidos, y altas para los caracteres tecnológicos. Las correlaciones genéticas entre

la carcasa y los caracteres de crecimiento fueron medias y altas, excepto para el rendimiento del filete frente a la longitud que fue baja. Dichos valores fueron bajo – medios entre los caracteres de composición y los de crecimiento, excepto con la humedad que fueron medias y negativas. Para los caracteres tecnológicos, todas las correlaciones genéticas con el crecimiento fueron media-altas. Para los caracteres tecnológicos con los de la carcasa los valores fueron altos, mientras que para con el peso del filete y el rendimiento filete fueron bajos. Los caracteres tecnológicos mostraron correlaciones genéticas medias con los contenidos en proteína y lípidos, y medias y negativas con la humedad.

Las interacciones genotipo-ambiente de todos los caracteres, a la talla de sacrificio, fueron medidas considerando los dos sistemas de cultivo de dorada, jaula y esteros en las Islas Canarias Andalucía, respectivamente. Las estimas fueron principalmente medias-altas para todos los caracteres (entre 0,46 y 1), excepto para FHA y FHB, los cuales fueron bajos (0,05 y 0,16, respectivamente).

Todos los resultados revelaron que el uso de puestas masales de días consecutivos permite maximizar la estructura familiar factorial, a través del incremento del número de reproductores que contribuyen a la descendencia y de familias de hermanos completos y medios hermanos, el control de la consanguinidad y la ganancia genética, por lo que es recomendable su uso en el diseño de programas de mejora genética en dorada. Los datos también ponen de relieve que los caracteres tecnológicos no invasivos (KET's), mostraron mejor variación genética aditiva que los caracteres biológicos, a la vez que una mayor precisión, lo que los erige como herramientas que pueden ser utilizadas en programas de mejora genética de dorada, permitiendo así un mayor respuesta a la selección para el crecimiento y la morfología de los peces, a través del incremento de la exactitud de la estima para los valores mejorantes y las tasas de respuesta a la selección.

## 1 Introducción general

### 1.1 Dorada (*Sparus aurata* L.)

#### 1.1.1 Taxonomía

La dorada *Sparus aurata* (Linnaeus 1758) tiene la siguiente clasificación taxonómica, según Greenwood *et al.* (1966):

**Phylum** : *Chordata*

**Subphylum** : *Gnathostomata*

**Clase** : *Actinopterygii*

**Subclase** : *Teleostei*

**Superorden** : *Neognathi*

**Orden** : *Perciformes*

**Familia** : *Sparidae*

**Género** : *Sparus*

**Especie** : *Sparus aurata*

#### 1.1.2 descripciones familiares

Los peces de la familia *Sparidae* ha oblonga cuerpo y por lo general lateralmente comprimido. Ellos son de agua salada y la mayoría de ellos son demersales, y se encuentran en aguas poco profundas. Sus huevos son pelágicos, esféricos (con un diámetro de alrededor de 1 mm) y tienen una gota de aceite. La mayoría de los espáridos son hermafroditas: son primeros machos y se convirtieron a hembras al alcanzar la madurez sexual (hermafroditismo protándrico) o son primeras hembras y se convirtieron en machos (hermafroditismo protógino). Debido a su excelente carne, muchos representantes de esta familia tienen un alto valor comercial. Espáridos incluyen muchos géneros y un gran

número de especies (más de 100) que viven en todos los mares tropicales y templadas, incluidas el agua excepcionalmente frías y salobres. Sólo en el Mediterráneo, hay once géneros: *Dentex*, *Sparus*, *Diplodus*, *Pagellus*, *Pagrus*, *Lithognatus*, *Spondylisoma*, *Oblada*, *Crenidens*, *Boops* y *Sarpa* (FAO, 2009).

### 1.1.3 características morfológicas y Biología

La dorada es un pez teleósteo de agua salada. Presenta un cuerpo con una forma ovalada, muy alto y comprimido lateralmente. El perfil de la cabeza es convexo con pequeños ojos. Las mejillas están cubiertas de escamas, y el hueso pre-opérculo es sin escamas. La boca tiene la mandíbula más corta que el maxilar superior. Ambas mandíbulas muestran caninos (4-6) y dientes con forma molar, en series de 2-4 en el maxilar superior y en series de 3-4, de las cuales 1-2 son notablemente más grande, en el maxilar inferior. Las hendiduras branquiales son cortas, 11-13 en el primer arco branquial y 7-8 en la parte baja. La línea lateral tiene 75-85 escamas. La aleta dorsal presenta 11 radios duros y 13 radios blandos, la aleta anal tiene 3 radios duros y 11-12 radios blandos. Las aletas pectorales son largas y puntiagudas, mientras que las ventrales son cortas. La aleta caudal tiene lóbulos puntiagudos. Todas las vértebras y las costillas presentan parapófisis y ausencia de costillas sésiles (FAO, 2009).

El color de la dorada es de color gris plateado con una gran mancha oscura en el comienzo de la línea lateral que cubre también la parte superior del hueso del opérculo. Una banda dorada y negra se encuentra entre los ojos, la dorada siempre se estrecha en la parte central. La aleta dorsal es de color azul-gris con una línea mediana de negro. La aleta caudal es de color blanco gris verdoso con puntas negras (Figura 1-1).

### 1.1.4 Distribución geográfica y hábitat

La dorada tiene una importante distribución geográfica. Se puede encontrar en el Mar Mediterráneo y el Océano Atlántico desde Gran Bretaña a Senegal, del mismo modo que su presencia es rara en el Mar Negro (Lythagoe, 1992; Moretti *et al.*, 1999).

Debido a sus hábitos eurihalinos y euritéricos, esta especie se encuentra en ambos ambientes de agua salobre, tales como lagunas costeras y estuarios, en particular durante las primeras etapas de su ciclo de vida marina. Nacido en el mar abierto durante octubre-

diciembre, los menores suelen migrar a principios de primavera hacia aguas costeras protegidas, donde pueden encontrar recursos tróficos abundantes y temperaturas más suaves.

Muy sensible a las bajas temperaturas (límite inferior de 4°C es letal), a finales de otoño regresan al mar abierto, donde los peces adultos crían. En mar abierto la dorada, por lo general, se encuentran en zonas rocosas y en prados de *Posidonia oceanica*, pero también se detecta con frecuencia en terrenos arenosos. Los peces jóvenes permanecen en zonas relativamente poco profundas (hasta 30 m), mientras que los adultos pueden llegar a aguas más profundas, generalmente no más de 50 m.

### 1.1.5 Alimentación y crecimiento

En la naturaleza, su dieta es principalmente carnívora. Es una especie depredadora de los moluscos (bivalvos y gasterópodos), crustáceos y peces pequeños. En general, se considera una especie de rápido crecimiento en la naturaleza, llegando a 300 g en el segundo año y 600 g en la tercera, y puede alcanzar un tamaño de 70 cm y un peso de 5 Kg (Castelló, 1993).

### 1.1.6 Reproducción

La dorada es una especie hermafrodita cuya época de reproducción se produce en un período más o menos prolongado en días cortos y decrecientes, ya sea a partir de octubre a diciembre en el Mediterráneo Occidental (Lumare y Villani, 1973; Suau y López, 1976; Arias, 1980), o un poco más tarde, entre noviembre y febrero en el Mediterráneo oriental (Gordin y Zohar, 1978; Ben-Tuvia, 1979). Durante los dos primeros años de su vida no tienen ovarios funcionales.

Esta especie es hermafrodita protándrica. La madurez sexual se desarrolla en los machos a los 2 años de edad (20-30 cm) y en las hembras a 2-3 años (33-40 cm). Las hembras son reproductores por lotes que pueden poner 20.000-80.000 huevos todos los días durante un período de hasta 4 meses. En cautiverio, cambio de sexo está condicionado por factores sociales y hormonales. Sus huevos son planctónicas, esférico y transparente, de 1 mm de diámetro y con una o varias gotas de aceite en el interior (Cejas *et al.*, 1992; Moretti *et al.*, 1999).

### **1.1.7 Historia de su cultivo**

Tradicionalmente, la dorada se cultivó extensamente en lagunas costeras y lagunas de agua salada, hasta que se desarrollaron sistemas de cría intensiva durante la década de 1980. El 'vallicoltura' italiano o el 'hosha' egipcio son sistemas de cría de peces extensivos que actúan como trampas para peces naturales, aprovechando la migración trófico natural de los juveniles del mar en lagunas costeras. La dorada es una especie muy adecuada para la acuicultura extensiva en el Mediterráneo, debido a sus hábitos de buen precio de mercado, la alta tasa de supervivencia y alimentación (que son relativamente bajos en la cadena alimentaria).

La reproducción artificial se llevó a cabo en Italia en 1981-82 y la producción a gran escala de los juveniles de dorada fue en 1988-1989 en España, Italia y Grecia. La producción de los criaderos y el cultivo de este pez es una de las historias de éxito en el negocio de la acuicultura. Esta especie demostró muy rápidamente una alta adaptabilidad a las condiciones de crianza intensiva en estanques y jaulas, y su producción anual aumentó regularmente hasta alcanzar 173.024 toneladas en 2013 (APROMAR, 2015).

### **1.1.8 Estado actual del cultivo**

La dorada es la especie de pez marino más importante de la acuicultura mediterránea y su producción se sigue expandiendo. Esta especie es producida en 20 países, la mayoría de la producción se produce en el Mediterráneo. Los principales productores son Grecia, con 71.000 t. (que representa el 41% de la producción total), Turquía con 37.000 toneladas (21,4%) y España con 16.230 t (9,4%) (Figura 1-2). Su cultivo se lleva a cabo en Egipto, Túnez, Italia, Chipre, Croacia, Malta, Israel, Francia y Portugal, y hay producciones emergentes en Albania, Argelia, Emiratos Árabes Unidos y Bosnia (APROMAR, 2015) (Figura 1-3).

La producción comercial de esta especie en Europa aumentó a finales de 1980 y los primeros de 1990, asistido por el aumento de la disponibilidad de los juveniles (Shields, 2001; Cañavate y Fernández, 2001), y como consecuencia de la fuerte inversión en investigación en esta especie (FEAP, 2008).

España es uno de los productores importantes de la dorada. En 2014, Valencia que sale por la producción de dorada de acuicultura con 8.662 t (53,4% del total), seguida de Murcia (3.892 t, 24%), Canarias (1.588 t, 9,8%), Andalucía (1.136 t, 7%) y Cataluña (952 t, 5,9%). Es de destacar una caída significativa en la producción en las Islas Canarias de casi la mitad de la producción (Figura 1-4).

En otros países como Egipto, la acuicultura es actualmente la principal fuente de suministro de pescado y representa casi el 77% de la producción total de pescado del país con más del 98% siendo producido a partir de granjas de propiedad privada. La mayoría de las actividades de acuicultura están situadas generalmente en la Región Norte del Delta del Nilo, con las granjas de peces que normalmente se encuentran agrupados en las zonas aledañas a los cuatro lagos de los deltas. La mayoría de los peces de cultivo son especies de agua dulce o aquellas que pueden crecer en agua salobre. La producción de peces y crustáceos en el agua del mar todavía está en sus primeras etapas y su desarrollo está influido por los problemas técnicos y económicos. La dorada se produce en cantidades limitadas en las granjas de peces marinos. La producción total de dorada ha aumentado de 3.365 toneladas en 2001 a 18.424 toneladas en 2014 (GAFRD, 2016).

### **1.2 La genética y sus aplicaciones en la acuicultura**

La genética es una herramienta de gran potencial, ya que se ha estimado que el uso de reproductores mejorados genéticamente por lotes para rasgos productivos, puede contribuir a una reducción del 50% de los costes de producción (Gjedrem *et al.*, 2012). La aplicación de esta ciencia en las plantas y los animales terrestres ha hecho una contribución sustancial al crecimiento de la productividad y la viabilidad de las industrias productoras de alimentos (Ponzoni *et al.*, 2007; Neira, 2010; Gjedrem *et al.*, 2012). Sin embargo, en comparación con los animales de granja, la aplicación de los principios de la genética cuantitativa en peces ha sido muy reciente y la mayoría de las especies de peces de cultivo en muchos países, especialmente los países en desarrollo, son genéticamente similares o inferiores a los salvajes. Aunque, en general, la respuesta a la selección suele ser mayor en los peces, moluscos y crustáceos que en los animales de granja (Olesen *et al.*, 2003), el desarrollo de los programas de mejora genética ha progresado lentamente (Neira, 2010; Rye *et al.*, 2010; Gjedrem *et al.*, 2012.). Menos del 10% de la producción acuícola se basa en poblaciones mejoradas genéticamente (Gjedrem *et al.*, 2012). Aunque las estrategias

genéticas en la acuicultura no son abundantes, ahora se ha aplicado con éxito en los programas de cría de salmónidos, carpas, tilapia, bagre y espáridos (Gjedrem, 1997; Gjedrem y Thodesen, 2005; Afonso *et al.*, 2012).

### 1.2.1 La cría selectiva

Los programas de mejora mejoran los valores genéticos de las poblaciones mediante la selección y el apareamiento sólo de los mejores reproductores, en concordancia con la idea de que transmiten su superioridad a su descendencia. Un programa de cría selectiva se diseña para mejorar la productividad a través de generaciones (una generación es la sustitución de los reproductores por sus crías), aumenta las tasas de crecimiento y los rendimientos gradualmente a lo largo de muchos años. Una de las características más importantes de la cría selectiva es que es la única que ofrece la oportunidad de ganancia genética continua y que puede ser transmitida de generación en generación (Ponzoni *et al.*, 2007, 2008). Hay dos razones principales para utilizar la reproducción selectiva con éxito en la acuicultura; a) En primer lugar, las especies de acuicultura tienen muy alta fecundidad permitiendo fuerte intensidad de selección; b) en segundo lugar, muchas características de interés en especies acuícolas tienen una heredabilidad alta, lo que significa que la selección de estas características puede ofrecer mejoras genéticas sustanciales (Gjedrem y Thodesen, 2005; Gjedrem *et al.*, 2012). Uno de los factores más importantes que afectan a la viabilidad del proceso de selección es la heredabilidad ( $h^2$ ). La heredabilidad es un concepto esencial para la estimación de los valores de cría, índice de selección sintético y respuesta a la selección (Falconer y Mackay, 1996). Por lo tanto, expresa cuánta de la variación fenotípica se explica por la variación genética aditiva, donde los factores ambientales también juegan un papel importante en cualquier programa de cría, dependiendo del carácter y la población. Por lo tanto, trabajar para reducir al mínimo los factores ambientales, tanto como sea posible, es importante para la ganancia genética, la superioridad dentro de la población, y las estimaciones fiables de la heredabilidad y de las correlaciones fenotípicas y genotípicas bajo un programa de cría (Gall y Huang, 1988).

Diferentes criterios de selección son posibles. La selección individual se refiere a la selección basada en el fenotipo del individuo con o sin control del apareamiento. Es un método sencillo y barato común en los peces, ya que no necesita identificación individual o el mantenimiento de los registros del pedigrí, y se basa simplemente en determinar un valor

## RESUMEN ESPAÑOL

---

de corte por debajo del cual todos los animales son desechados, mientras que los que están por encima del mismo se conservan. La selección individual es más eficaz en caracteres con alta heredabilidad, por tener una alta precisión de selección. Para la mejora de dos o más caracteres, se requiere de un enfoque más eficaz y que consiste en un índice sintético multicarácter (Tave, 1995). Los programas de cría en peces basados en la selección masal tienen el riesgo de la endogamia, porque con sólo algunos padres se producen grandes progenies.

Algunos experimentos han sido incapaces de generar mejora en una población utilizando la selección masal, debido a la falta de variación genética dentro de la población de partida (Teichert-Coddington y Smitherman, 1988) o a una gran reducción de la heredabilidad en las generaciones subsiguientes (Dunham y Brummett, 1999). Hulata *et al.* (1986) no observaron ninguna mejora en la tasa de crecimiento en tilapia del Nilo (*Oreochromis niloticus*) después de dos generaciones de selección masal, lo atribuyeron a una serie de posibles factores, entre ellos la endogamia y la deriva genética. Un factor importante con gran efecto en el fenotipo del individuo, y la eficiencia del proceso de selección, es la varianza ambiental, que tiene que ser minimizada para asegurar que los individuos genéticamente superiores sean detectados más fácilmente, cuando la selección está basada únicamente en la medición de su fenotipo (Kirpichnikov, 1981). La selección masal es un método sencillo, sin estructura, y podría dar lugar a problemas a menos que el número de padres sea grande (Gjerde *et al.*, 1996; Villanueva *et al.*, 1996), y aún así, el azar podría tener un efecto negativo.

Otro método de selección es el basado en la estructura familiar, que también es un ampliamente utilizado en la acuicultura de peces. Puede ser implementado de dos maneras, entre familias (selección familiar) y selección dentro de la familia (selección intrafamiliar) o como una combinación de estos tipos (selección combinada). La selección familiar, depende de la disposición de las familias en un rango y son las mejores familias las que son seleccionadas, ya sea toda la familia o una muestra aleatoria de la misma, para propagarse a la siguiente generación. Mientras que la selección intrafamiliar es la selección individual aplicada dentro de cada una de las familias de la población, por lo que cada familia contribuye con los mejores individuos. El criterio de este tipo de selección es la desviación de cada individuo respecto de la media de la familia a la que pertenece. Finalmente, la combinación de ambos tipos de fuentes de información, dentro y entre, es un método más

preciso, en que los mejores animales son seleccionados dando lugar a una mayor intensidad de selección y por tanto a una mayor respuesta a la selección en cada generación (Gjerde y Rye, 1998). La selección familiar es un método ampliamente utilizado, y permite la selección de caracteres de heredabilidad baja. Además, la selección familiar es útil para caracteres tales como resistencia a enfermedades y características de la canal (que son solamente medibles después del sacrificio), frente a la selección individual (Bentsen, 1990). Selección familiar también contrarresta la mayor parte de la variación debida al ambiente, y por lo tanto hace que sea más fácil identificar las diferencias genéticas en la población (Herbinger y Newkirk, 1990). El uso de información de la familia ofrece una mayor precisión de la selección, pero requiere la identificación de la estructura genealógica para establecer las medias familiares (Aleandri y Knibb, 1999). Selección familiar se basa en la capacidad de separar las familias, que se puede obtener mediante marcaje individual o el etiquetado de las familias para que puedan ser criadas de manera conjunta (Wohlfarth y Moav, 1985).

### 1.2.2 Los marcadores genéticos

El desarrollo de marcadores moleculares basados en el ADN ha tenido un impacto revolucionario en la genética animal. Con los marcadores moleculares, teóricamente es posible observar y explotar la variación genética en el genoma completo (Liu y Cordes, 2004). Su aplicación ha permitido un rápido progreso en las investigaciones de acuicultura de la variabilidad genética y la consanguinidad, las asignaciones de paternidad, las especies y la identificación de estirpes, la construcción de mapas de ligamiento genético de alta resolución para las especies de acuicultura y la identificación de marcadores genéticos asociados con *loci* de caracteres cuantitativos (QTL), así como el uso de estos marcadores en los programas de selección (selección asistida por marcadores; MAS). Existen varios tipos de marcadores moleculares que han sido muy populares en la genética de la acuicultura (Liu y Cordes, 2004; Hashimoto *et al.*, 2009, 2010), tales como las aloenzimas (Wilson *et al.*, 1995) y el ADN mitocondrial (Funkenstein *et al.*, 1990), el polimorfismo de fragmentos de restricción (RFLP) (Botstein *et al.*, 1980), la amplificación aleatoria de ADN polimórfico (RAPD) (Welsh y McClelland, 1990), la amplificación de fragmentos de longitud polimórfica (AFLP) (Vos *et al.*, 1995), los microsatélites (Tautz y Renz, 1984), el polimorfismo de nucleótido simple (SNP), y los marcadores de expresión (EST). Especialmente los microsatélites, han revolucionado el uso de marcadores moleculares en la

acuicultura, y desde 1999, y los años subsiguientes, han dominado este tipo de estudios (Magoulas, 1999).

### 1.2.3 Los marcadores microsatélites

Los microsatélites o repeticiones de secuencias simples (SSR), son marcadores moleculares formados por unidades repetidas en tándem de secuencias cortas de 1-6 nucleótidos, y se distribuyen en abundancia través de los genomas (Tautz, 1989; Litt y Luty, 1989). Los microsatélites muestran altos niveles de polimorfismo alélico (Chistiakov *et al.*, 2006). Los alelos difieren en la longitud de los fragmentos de ADN que contiene el microsatélite, debido a la variación en el número de repeticiones de la región consenso. La tasa de mutación de los microsatélites se estima entre  $10^{-2}$  y  $10^{-6}$  por *locus* por generación (Ellegren, 2000). Parece causada por del deslizamiento de la polimerasa durante la replicación del ADN, dando lugar a diferencias de resultado en el número de repeticiones de la región de consenso (Tautz, 1989). La mayoría de los microsatélites son dinucleótidos (30-67%). (AC)<sub>n</sub> es el motivo dinucleótido más común en el genoma de los vertebrados. Es 2,3 veces más frecuente que (AT)<sub>n</sub>, que es el segundo tipo más general de dinucleótidos (Toth *et al.*, 2000). Los microsatellites son marcadores codominantes con la herencia mendeliana simple. Ellos son relativamente pequeños y pueden amplificarse fácilmente mediante PCR utilizando cebadores, que están diseñados a partir de sus regiones flanqueantes. Los productos de amplificación se separan por tamaño a través de electroforesis para detectar los alelos y el polimorfismo de los microsatélites.

En el ámbito de la pesca y la acuicultura, los microsatélites son útiles para el estudio de la variabilidad genética y la consanguinidad, las asignaciones de paternidad, identificación genética de las poblaciones, la selección y los programas de mejora genética, la construcción de mapas de ligamiento densos, determinación de QTL y los programas de mejora asistida por marcadores. Por lo tanto, un gran número de marcadores de microsatélites se ha descrito en las especies de peces de acuicultura. Al igual que en el salmón del Atlántico (Sletten *et al.*, 1997; Skaala *et al.*, 2004), el pez gato (Liu *et al.*, 1999, 2001; Serapion *et al.*, 2004), tilapia ( Lee y Kocher, 1998; Palti *et al.*, 2001; Carleton *et al.*, 2002; Streelman y Kocher, 2002; Cnaani *et al.*, 2002; Rowena *et al.*, 2004), la carpa común (Crooijmans *et al.*, 1997; Tanck *et al.*, 2001; Liang *et al.*, 2003; Kohlmann *et al.*, 2003; Yue *et al.*, 2004; Lal *et al.*, 2004; Sun *et al.*, 2004; Li *et al.*, 2007), salmón chinook (Williamson

*et al.*, 2001; Naishy Park., 2002), la trucha arco iris (Rexroad *et al.*, 2001, 2002a, 2002b; Nathan *et al.*, 2007), y el lenguado senegalés (Funes *et al.*, 2004).

En las especies de espáridos, numerosos marcadores de microsatélites, con un alto polimorfismo, se han utilizado en la dorada (Magoulas, 1999; Batargias *et al.*, 1999; Launey *et al.*, 2003; De Innocentiis *et al.*, 2004, 2005; Brown *et al.*, 2005; Oliva *et al.*, 2005; Senger *et al.*, 2006; Castro *et al.*, 2007; Navarro *et al.*, 2008; Porta *et al.*, 2010; Lee-Montero *et al.*, 2013; Negrín-Báez *et al.*, 2015), Dorada japonesa (Takagi *et al.*, 1997), Dorada australiana (Adcock *et al.*, 2000), la mancha negra dorada (Stockley *et al.*, 2000; Piñera *et al.*, 2006), breca (Ramšak *et al.*, 2003) y sama roquera (Ponce *et al.*, 2006; Navarro *et al.*, 2008).

### 1.2.4 Reacciones Múltiple en cadena de la polimerasa

En los programas de selección modernos, los marcadores microsatélite permiten la identificación de descendientes criados en un mismo ambiente y además ayudan en los procesos de selección (García de León *et al.*, 1998). El uso de un número de microsatélites alto habitualmente genera altos costos debido a los materiales y el personal requerido. Sin embargo, la reducción de costes se puede lograr a través de la implementación de reacciones múltiples. Es la combinación de los productos de amplificación de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR simples) de varios marcadores en una misma reacción, que luego son cargados en un mismo pocillo de gel de electroforesis o secuenciador (Olsen *et al.*, 1996; Chamberlain *et al.*, 1988; Neff *et al.*, 2000). Esta es una variante de la PCR en la que dos o más secuencias diana se pueden amplificar mediante la inclusión de más de un juego de cebadores en la misma reacción. La PCR múltiplex requiere que los cebadores amplifiquen las regiones únicas de ADN, tanto de manera individual como en combinación con otros juegos de cebadores, bajo las mismas condiciones de reacción. Además, los métodos deben estar disponibles para el análisis de cada producto de amplificación individual de la mezcla de todos los productos (Markoulatos *et al.*, 2002).

Para el éxito de un ensayo de PCR multiplex es importante la concentración relativa de los cebadores, la concentración del tampón de PCR, el equilibrio entre el cloruro de magnesio (MgCl<sub>2</sub>) y las concentraciones de desoxinucleótidos (dNTPs), las temperaturas de hibridación, y las cantidades de ADN molde y Taq-polimerasa. Una combinación óptima de la temperatura de hibridación y la concentración del tampón es esencial en la PCR multiplex

## RESUMEN ESPAÑOL

---

para obtener productos de amplificación altamente específicos. La concentración de  $MgCl_2$  sólo tiene que ser proporcional a la cantidad de dNTPs, mientras que el ajuste de concentración de cebador para cada secuencia diana también es esencial (Markoulatos *et al.*, 2002).

La presencia de más de un par de cebadores en la PCR multiplex aumenta la posibilidad de la obtención de productos de amplificación no deseables (Markoulatos *et al.*, 2002). Uno de los conceptos más importantes de la PCR multiplex es la óptima relación entre los cebadores. En la optimización de la PCR múltiple debe reducirse al mínimo las interacciones inespecíficas. Los parámetros como la homología de cebadores con sus secuencias objetivo, duración, contenido de GC y la concentración, tiene que ser considerado para el diseño de cebadores (Brownie *et al.*, 1997). La concentración final de los cebadores puede variar considerablemente entre los *loci* y establecido empíricamente. Cuando hay amplificación desigual, se requiere cambiar las proporciones de varios cebadores en la reacción, el aumento de la concentración de cebadores de los *loci* "débil" y la disminución de la concentración de los *loci* "fuerte" (Navarro *et al.*, 2008).

El desarrollo de las reacciones multiplex presenta la principal ventaja de optimizar la relación coste-eficacia (Wesmajervi *et al.*, 2006; Navarro *et al.*, 2008), sin perder la consistencia de genotipado y la resolución de las bandas (Neff *et al.*, 2000). Renshaw *et al.* (2006) reportaron un coste inferior del material en reacciones múltiples frente a reacciones individuales. Estos autores demostraron que la determinación del genotipo de una muestra en reacciones tetraplex y Octaplex fueron 3,5 y 6,7 veces menor que mediante reacciones individuales, respectivamente. También informaron de los valores de ahorro similares en el tiempo del personal. Neff *et al.* (2000) requiere una cuarta parte de los consumibles de PCR para el genotipado de cuatro marcadores de microsatélites con una reacción tetraplex que con las reacciones individuales. Navarro *et al.* (2008) compararon el personal, consumibles y los gastos de funcionamiento para el genotipado con diez marcadores de microsatélites en una sola PCR múltiple frente a las PCR individuales y por separado, y los resultados revelaron que en la reacción múltiple los costes eran la sexta parte que en las reacciones individuales, incluso cuando estos se realizaron en una carrera única. Por otra parte, las reacciones multiple también minimizan errores de genotipado ya que reducen pasos durante el proceso de análisis de la muestra e introducen automatización. Bonin *et al.* (2004) analizaron el doble de dieciocho marcadores microsatélites con solo una reacción de PCR en

34 muestras de oso pardo, y encontró sólo un 0,8% de los errores de genotipado debidos a factores humanos. Por otra parte, la PCR multiple reduce el riesgo de contaminación y evita la mezcla de los genotipos de diferentes muestras (Navarro *et al.*, 2008).

Sin embargo, en espáridos, se han propuesto pocas reacciones múltiples con una gran cantidad de microsatélites. En la breca, Ramšak *et al.* (2003) desarrollaron una PCR múltiple con tres marcadores microsatélites por medio de la técnica de *touchdown* (amplificación gradual a diferentes temperaturas). Para la dorada, Launey *et al.* (2003) propusieron dos reacciones múltiples de tres y cinco marcadores. Brown *et al.* (2005a) desarrolló y comprobó la amplificación de una PCR multiple de cuatro marcadores microsatélites, y Porta *et al.* (2010) propusieron dos reacciones múltiplex de cuatro y seis marcadores como una herramienta de genotipado. Todos estas multiples de PCR fueron diseñadas mediante la combinación de marcadores microsatélites con idénticas temperaturas de hibridación. Navarro *et al.* (2008), también en la dorada, desarrollaron dos reacciones múltiples de diez y siete marcadores microsatélites interespecíficos rediseñados, y mostró una amplificación cruzada exitosa en bocinegro, sama roquera y dorada con seis, ocho y cinco marcadores, respectivamente. Lee-Montero *et al.* (2013) desarrollaron el primer panel normalizado de dos nuevas PCR múltiples with 11 marcadores en cada una, denominadas SMsa1 y SMsa2 (Super Multiplex *Sparus aurata*). Negrín-Báez *et al.* (2014) establecieron un conjunto de 13 PCR múltiples de marcadores microsatélites específicos (106) como una herramienta para la detección de QTL en la dorada (*Sparus aurata* L.).

### 1.2.5 Matriz de relación y contribución familiar

Muchas especies de peces, incluyendo la dorada, permiten la realización de cruces individuales viables (Knibb *et al.*, 1998; Montero *et al.*, 2001). Sin embargo, su aplicación en el contexto de la industria presenta problemas, ya que aumenta los costos de producción en términos de recursos humanos e infraestructura. En condiciones industriales, para garantizar la calidad y cantidad de la producción, esta especie se propaga a través de puestas masales, de aproximadamente 40 - 60 reproductores. Desde un punto de vista genético, esta estrategia muestra la ventaja de que las fuentes de parecido provenientes del ambiente común se reducen, aumentando así la precisión de la estima de parámetros genéticos (Herbinger *et al.*, 1999). Por otro lado, las puestas masales evitan el conocimiento de la genealogía de los peces en condiciones de cultivo, lo que es absolutamente necesario en la

estimación de parámetros genéticos y el desarrollo de programas de selección. Debido a eso, la introducción de programas de mejora genética con sistemas de puestas masales a escala industrial requiere del etiquetado físico, para identificar todos los individuos en relación con el análisis de ADN y reconstruir la genealogía (Navarro *et al.*, 2008), ya que la matriz de relaciones entre los individuos es un requisito fundamental para estimar parámetros genéticos de los caracteres de interés económico para la industria. El uso de marcadores genéticos, es una herramienta de reconstrucción de pedigrí o matriz de parentesco dentro de un grupo de los descendientes, por lo general provenientes de desoves masales de sólo uno o varios días. Sin embargo, el desove masal tiende a reducir el número de reproductores que contribuye a la generación siguiente, y por tanto también el censo efectivo (Brown *et al.*, 2005; Fessehaye *et al.*, 2006; Pinera, 2009; Porta *et al.*, 2010). La matriz de parentesco entre los individuos es clave para estimar parámetros genéticos de los caracteres de interés económico para la industria (Navarro *et al.*, 2009a, b).

Por otro lado, la contribución es un acontecimiento trascendental en la genética, pero particularmente importante en la dorada, cuando se quiere implementar la mejora genética en su sistema de producción a nivel de criadero. Sin embargo, la alta tasa de fecundidad de dorada permite producir lotes de peces a partir de sólo un par de reproductores bajo puesta masal, lo cual es una desventaja importante desde el punto de vista de la mejora, ya que ello podría llevar a que los reproductores de alto valor genético no contribuyan en tales circunstancias, lo que evitaría maximizar la respuesta a la selección. Así, es de una gran importancia práctica para las empresas el maximizar la contribución de los reproductores, bajo desove masal a escala industrial.

### 1.2.6 Interacción genotipo x ambiente

El estudio de la interacción genotipo-ambiente (G x E) es un problema importante en la etapa final de la cría, lo que representa un aspecto de gran importancia en los programas de mejora genética. Las interacciones pueden implicar cambios en el orden de importancia para los genotipos entre los ambientes y los cambios en la magnitud absoluta y relativa de las varianzas genéticas, ambientales y fenotípicas entre los ambientes (Bowman, 1972). Por lo tanto, la importancia de este factor puede aparecer sobre todo en las especies de peces que su sistema de producción tiene diferencias ambientales significativas, como sucede en la dorada.

La dorada es producida por diferentes sistemas de producción, con grandes diferencias ambientales entre ellos. En los criaderos, los alevines se producen utilizando sistemas intensivos o semi-intensivos, y en la etapa de engorde los peces pueden cultivarse en diversas formas: en estanques y lagunas costeras, con métodos extensivos y semi-intensivos, o en instalaciones terrestres y en jaulas marinas, con sistemas de cría intensiva. Estos sistemas e instalaciones de producción tienen efecto sobre los valores fenotípicos, especialmente en el crecimiento y caracteres de calidad del pescado (Navarro *et al.*, 2009a, b). Por lo tanto, las diferencias ambientales pueden aumentar o disminuir los valores fenotípicos, interactuar y producir la interacción GxE (Falconer y Mackay, 1996). Por lo tanto, para desarrollar un programa de mejora genética eficiente, es esencial la determinación de las interacciones genotipo-ambiente con el fin de conocer la capacidad de cualquier expansión industrial con la minimización de su impacto sobre la ganancia genética. GxE interacciones pueden ser estimadas por la reclasificación de los individuos de las mismas familias en dos ambientes diferentes, estableciendo las correlaciones genéticas del mismo carácter en los dos ambientes, bajo la consideración de que fuesen dos caracteres distintos (Falconer y Mackay, 1996). Navarro *et al.* (2009a, b) estimaron la interacción GxA en la dorada para caracteres de crecimiento a través de las correlaciones genéticas de los mismos en dos ambientes (jaulas y tanques), y encontraron reclasificaciones débiles entre las jaulas marinas y los tanques (con correlaciones genéticas entre 0,70 y 0,99), que fueron consideradas como poco importantes. Lee-Montero *et al.* (2015) estimaron valores altos de correlaciones genéticas en la dorada para el crecimiento y deformidades esqueléticas, a la edad de sacrificio en diferentes condiciones ambientales, lo que revela que las GxE son escasas. Lo que está en consonancia con los resultados de Sae-Lim *et al.* (2013), quienes demostraron que las correlaciones genéticas con los valores más altos de 0,7 probablemente no constituyen interacciones GxE importantes.

### **1.3 Estado de las aplicaciones de la selección genética en acuicultura**

Durante los últimos veinte años, la acuicultura juega un papel importante en la reducción de la brecha alimentaria para cubrir las necesidades humanas en términos de proteínas de origen animal, sobre todo por los beneficios positivos que tiene para la salud humana, debido principalmente al efecto protector de los lípidos de peces frente a enfermedades cardiovasculares. En 2013, por primera vez, la producción acuícola en todo el mundo superó el sector de la pesca con 97,2 millones de toneladas, frente a los 93,8

millones de toneladas de pesca. Así, más del 50% de los productos acuáticos procede de la acuicultura (APROMAR, 2015).

En general, los programas de cría modernos para las especies de acuicultura se han establecido más tarde que en las plantas y los animales terrestres. Por lo tanto, muchos productores de peces, moluscos y crustáceos todavía utilizan poblaciones silvestres o poblaciones de producción a sólo unas pocas generaciones de distancia de su origen silvestre (Tave, 1986). Aunque, en general, la respuesta a la selección suele ser mayor en los peces, moluscos y crustáceos que en los animales domésticos terrestres, y su potencial de ganancia genética está bien documentado, el desarrollo de programas de selección genética ha progresado lentamente (Neira, 2010; Rye *et al.*, 2010; Gjedrem *et al.*, 2012). Actualmente, existe una creciente necesidad de las empresas de acuicultura por mejorar su competitividad mediante la optimización de su producción y/o aumentar la calidad de sus productos. En este sentido, la genética es una herramienta de gran potencial, de la que se ha estimado que su uso, en el contexto de la mejora genética para lotes de reproductores en caracteres de interés productivo, puede contribuir a una reducción del 50% de los costes de producción (Gjedrem *et al.*, 2012). Aunque la tasa de progreso genético puede parecer pequeña, con respecto a las atribuibles a los avances en los factores de manejo, debe tenerse en cuenta que éste es continuo, acumulativo y permanente (López-Fanjul y Toro, 2007). Como se muestra en la tabla 1-1, la carpa común, la trucha arco iris, el salmón del Atlántico, tilapia, bagre de canal y peces ornamentales, son las especies que recibieron el esfuerzo genético más importante. Sin embargo, hay otras especies de alto valor, tales como, la lubina, la dorada y el rodaballo, que recientemente han incorporado programas de cría selectiva aplicada (Chavanné *et al.*, 2016).

### **1.4 Estado de la mejora genética de la dorada**

Al igual que en otras especies de la acuicultura, la mejora genética en dorada está muy poco extendida, y el crecimiento de esta industria ha invertido en la optimización de sus producciones a través de otros factores, principalmente de gestión, tales como la nutrición, la reproducción o la prevención de enfermedades. Las razones se deben en parte a la falta de personal especializado, el alto costo que supone para las empresas organizar su producción con criterios genéticos, las características biológicas de la dorada, y a la falta de una metodología que combine los intereses de la producción con la explotación de la

variación genética. Aunque hay algunos programas a nivel de empresa de cría de esta especie (Rye *et al.*, 2010; Chavanné *et al.*, 2016; Janssen *et al.*, 2016), sólo se han publicado algunos parámetros genéticos, y menos aún se han estimado bajo condiciones industriales.

Knibb *et al.* (1997) estimaron una heredabilidad de  $0,34 \pm 0,02$  para el peso al sacrificio utilizando los coeficientes de regresión de las líneas de selección. Thorland *et al.* (2006), estimaron las heredabilidades para el peso al sacrificio (250-400 g) ( $0,61 \pm 0,06$ ), el color de la piel evaluados por una escala discreta ( $0,20 \pm 0,02$ ), y la presencia o ausencia de deformidad de la cabeza ( $0,05 \pm 0,02$ ) y deformidades de la columna ( $0,12 \pm 0,02$ ). Antonello *et al.* (2009) estimaron los parámetros genéticos para los caracteres de crecimiento ( $0,38 \pm 0,07$  para la longitud) y la resistencia a la pasteurelisis en dorada ( $0,12 \pm 0,04$  to  $0,45 \pm 0,04$  para la resistencia a enfermedades). Navarro *et al.* (2009a, b), fueron los primeros autores en estudiar y estimar las heredabilidades para un gran número de caracteres (crecimiento, rendimiento y de la composición corporal), bajo condiciones industriales, así como sus características fenotípicas y relaciones genéticas. Estos autores describieron valores que oscilaron entre  $0,28 - 0,34$  para el peso,  $0,27 - 0,35$  para la longitud,  $0,05-0,13$  para el factor de condición,  $0,02-0,5$  para caracteres de composición corporal y  $0,12-0,41$  para caracteres de rendimiento. Lee-Montero *et al.* (2015) estimaron, por primera vez en esta especie, los parámetros genéticos de las deformidades esqueléticas (desde  $0,07$  hasta  $0,26$ ) y las características de crecimiento a diferentes edades comercialmente importantes (desde  $0,20$  to  $0,41$  para la longitud, y  $0,17$  a  $0,43$  para el factor de condición), teniendo en cuenta las interacciones GxE, que fueron escasas. Estas estimaciones de heredabilidades son muy alentadoras y son de la misma magnitud que las descritas en otras especies cultivadas intensivamente como el salmón del Atlántico (Standal y Gjerde, 1987), y la trucha arco iris (Mckay *et al.*, 1986).

Esto indica que hay un gran potencial de mejora en algunas características importantes, como el peso, a través de la cría selectiva de dorada. En esta especie, los programas de cría que están en funcionamiento llevan un número de generaciones de selección comprendidas entre 1 y 5. Las estimaciones de ganancia genética para el peso al sacrificio son del 29% por Brown (2003), del 19% por Navarro *et al.* (2009) y Lee-Montero *et al.* (2015), del 13% por Thorland *et al.* (2015) después de 2,6 generaciones de selección, y de entre 5-10% en la tasa de crecimiento por Knibb (2000). Actualmente, alrededor de 31-

44% la producción de dorada es llevada a cabo con semillas seleccionadas a nivel comercial (Chavanne *et al.*, 2016).

### 1.5 Caracteres de importancia económica en dorada en los programas de mejora genética

Dentro de los posibles caracteres a mejorar en dorada a nivel industrial, son especialmente interesantes todos aquellos cuya optimización conduce a una producción económica más rentable. Es muy importante que antes de comenzar cualquier programa de cría se deban definir las metas u objetivos de la mejora (Gjedrem, 2000).

Los costos de la alimentación en los proyectos de producción de animal, incluidos los peces, representa más del 65% del coste total, por lo que el carácter de conversión alimenticia (FCR) es uno de los rasgos económicos más importantes en este tipo de proyectos (Kause *et al.*, 2006). Sin embargo, debido a la dificultad de medir este carácter en peces en condiciones industriales, su mejora generalmente se realiza indirectamente a través de las características de crecimiento (peso, longitud y SGR) (Gjedrem y Thodesen, 2005; Navarro *et al.*, 2009a, b), ya que tiene una correlación genética alta y positiva con estos caracteres (McPhee *et al.*, 1979; Afonso, 1996).

Los caracteres de rendimiento y canal son también caracteres de mucha importancia económica, debido a que las canales y la carne de pescado se utilizan para el consumo humano (Souza, 2008). La fabricación de productos elaborados, como el fileteado, representa un sector muy interesante para la industria y el mercado de consumo. Si bien, este tipo de comercialización está sin explotar en la dorada, estudios de mercado muestran que de implementarse habría una demanda interesante, rentable y de alta (Luna, 2006). Por lo tanto, es importante utilizar características de la canal como criterios de selección relacionados principalmente con el rendimiento filete (Silva *et al.*, 2009). En este sentido, las mediciones morfométricas se pueden utilizar para evaluar la calidad de la canal como criterio de selección en los programas de mejora genética y para obtener respuesta correlacionada en el rendimiento (Rutten *et al.*, 2004).

Hoy en día, los consumidores están interesados en los aspectos relacionados con la calidad de la carne, como sabor, jugosidad, textura y apariencia que se asocia significativamente con la composición corporal (Navarro *et al.*, 2009b). Los caracteres de

calidad de la carne y de su composición, tales como el contenido de lípidos, son también caracteres muy importantes, que tienen potencial como caracteres indicadores de mejora selectiva de eficiencia de la alimentación (Pym, 1990; Archer *et al.*, 1999). El contenido de grasa en el músculo es un componente muy importante, con una correlación positiva con el sabor y la jugosidad (Grigorakis, 2007).

La apariencia es uno de los caracteres económicos más importantes que afecta a la comercialización del producto (Blonk *et al.*, 2010; Costa *et al.*, 2011). La importancia de este carácter es cada vez mayor en productos animales comercializados enteros, como la dorada. Además, las características morfológicas de los peces determinan dramáticamente otros caracteres tales como la compacidad y características de la canal. Por lo tanto, el peso de filete está estrechamente relacionado con la longitud y la altura de filete. Para aumentar la eficacia de cualquier programa de selección, los caracteres económicos importantes se deben medir de manera objetiva y precisa, y a un bajo coste (Gjedrem, 1997). En este sentido, Navarro *et al.* (2016) desarrollaron un programa para el análisis rápido y automatizado de imágenes (IMAFISH\_ML), que mide 27 caracteres morfométricos (caracteres no invasivos) en tres especies de peces de interés comercial: dorada (*Sparus aurata* L.), corvina (*Argyrosomus regius*) y bocinegro (*Pagrus pagrus*). Estos caracteres están relacionados con el crecimiento, la canal y la composición de la carne, que son los caracteres más importantes en la mayoría de los programas de mejora genética en peces. Hay algunas publicaciones potenciales que estimaron los parámetros genéticos para algunas de las características morfológicas de los peces. En trucha arco iris, Gjerde y Schaeffer, (1989) y Kause *et al.* (2003), demostraron que caracteres relacionados con la morfología corporal, el color de la piel y su distribución pueden ser modificados a través de la selección genética. Así, estimaron unas heredabilidades de entre 0,46-0,61 y 0,29-0,5 para las escalas subyacente y fenotípica, respectivamente. En Tilapia del Nilo, Rutten *et al.* (2005) encontraron que hubo una fuerte relación entre las medidas corporales y el peso del filete. Kocour *et al.* (2007), en carpa común, estimaron parámetros genéticos para caracteres de crecimiento y de procesamiento, encontrando que la longitud estándar, el peso corporal, el porcentaje de grasa y la longitud relativa de la cabeza mostraban heredabilidades altas (>0,5), mientras que la altura relativa del cuerpo, el ancho relativo del cuerpo, el rendimiento canal y filete tenían heredabilidades medias (0,2-0,5). Costa *et al.* (2010), en lubina, estimaron efectos genéticos y ambientales para la forma, encontrando altas heredabilidades (0,4-0,55), habiendo con una buena correlación entre las diferencias en la forma con las distancias

geográficas entre los stocks analizados. En solea común (*Solea solea*), Blonk *et al.* (2010) compararon estimaciones de parámetros genéticos de la forma y las medidas corporales, obtenidos mediante análisis digital de imágenes y medida manual. Los resultados mostraron que las estimaciones de parámetros fueron similares entre ambas metodologías de medición. La heredabilidad para la forma mediante análisis digital de la imagen fue de  $0,34 \pm 0,11$ .

### Justificación y objetivos

La dorada es una de las especies más importantes en la acuicultura mediterránea. El crecimiento de la industria ha ido acompañado de un aumento de la competitividad de las empresas para minimizar los costos y mejorar los productos. Debido a eso, la industria ha invertido en la optimización de sus producciones a través de factores, principalmente de gestión tales como la nutrición, la reproducción o la prevención de la enfermedad. Esto se debe en parte al alto coste para las empresas en organizar su producción con criterios genéticos. A pesar de que la tasa de progreso genético puede parecer pequeña, con respecto a las atribuibles a los avances en los factores de manejo, es continuo, acumulativo y permanente (López-Fanjul y Toro, 2007). En condiciones industriales, esta especie se propaga a través de puestas masales, y requiere del etiquetado físico para identificar todos los animales relacionados mediante el análisis de ADN para reconstruir la genealogía (Navarro *et al.*, 2008). Sin embargo, es necesaria más información acerca de las estrategias de cómo obtener una representación máxima de las familias y un mejor manejo de la población para la evaluación genética, con el objeto de llevar a cabo estimaciones óptimas de la variación genética.

Para maximizar el progreso genético en cualquier programa de cría selectiva, hay varios aspectos que deben ser tomados en cuenta, (a) El tamaño mínimo de las familias, (b) Igual tasa de reproductores por sexo, y (c) La varianza de la contribución familiar (Falconer y Mackay, 1996). El establecimiento de cruces dirigidos con tamaños homogéneos familia requiere amplias instalaciones, solamente posible en las grandes empresas multinacionales con la producción a gran escala. Sin embargo, para los pequeños productores, a los que no es fácil hacer frente a dichos gastos, es difícil competir a menos que hagan productos altamente especializados. Por lo tanto, aunque los aspectos mencionados anteriormente sobre la contribución de la familia son ciertos, una combinación de baja consanguinidad y

aumentó el número de la familia puede ofrecer una alternativa para aquellas empresas que no pueden establecer programas a gran escala. En un programa de selección genética, los animales se clasifican de acuerdo a su talento genético en un carácter dado o grupo de caracteres, de una manera que en el apareamiento bajo puesta masal se produzca una consanguinidad mínima. Pero ¿qué sucede con los reproductores que no se aparean, cuando son "ideales" para la producción de nuevos genotipos de mayor talento genético?. De suceder esto último, la oportunidad de obtener mejores combinaciones genéticas por unidad de tiempo disminuirá.

Antes de iniciar un programa de cría, los objetivos de la mejora (es decir, los caracteres biológicos de interés comercial para las empresas), y los criterios de selección (los caracteres a través de los cuales se lleva a cabo la selección), deben ser definidos (Gjedrem, 2000). Otro aspecto esencial es cómo los caracteres deben ser medidos, por lo que con la estandarización de los métodos de medición permite la comparación entre y dentro de las empresas y programas, y al mismo tiempo aumenta los valores de las estimaciones de los parámetros genéticos (Afonso et al., 2012). Cuando los programas de selección son desarrollados, uno de los aspectos más importantes es la perfecta definición de los criterios de selección, de una manera precisa y objetiva (sin sesgo), y a un bajo coste (Gjedrem, 1997). Así, la obtención de grandes matrices de datos a partir de diferentes localizaciones, pueden ser realizadas con metodologías diferentes, lo cual introduce fuentes de variación ambiental, lo que hace difícil en algunos casos disponer de datos comparables. Todo lo cual puede afectar a las estimadas de parámetros genéticos, y aumentando la variación ambiental. Por lo tanto, una de las maneras más importantes para maximizar las estimaciones de los parámetros genéticos de un carácter, y por lo tanto el progreso genético entre generaciones, es el desarrollo de nuevas herramientas tecnológicas y de caracteres derivados, los cuales, desde el punto de vista genético, tengan una alta correlación genética con los caracteres biológicos importantes e interesantes para la industria.

Teniendo en cuenta todo esto, los objetivos del presente estudio son:

- 1- Optimizar el modelo factorial de la estructura familiar mediante puestas masales consecutivas, bajo condiciones industriales de cultivo.
- 2- Estudiar la variabilidad genética aditiva de los caracteres biológicos de la segunda generación del programa de selección genética PROGENSA (denominada INNOTECCS).

## **RESUMEN ESPAÑOL**

---

3- Estudiar la variabilidad genética aditiva de nuevos caracteres tecnológicos no invasivos (Tecnologías facilitadoras clave; KET's)

4- Estudiar las correlaciones genéticas entre caracteres biológicos y caracteres tecnológicos no invasivos, para identificar nuevas metodologías que permitan llevar a cabo evaluaciones genéticas a escala industrial de manera más masiva, cuantiosa, precisa y económica.

5- Cuantificar la interacción Genotipo-Ambiente para caracteres biológicos y caracteres tecnológicos no invasivos, a través de la evaluación de descendientes de las mismas familias en diferentes localizaciones-sistemas de cultivo.

## **2. Materiales y Métodos**

### **2.1 Optimización de la estructura familiar factorial en dorada (*Sparus aurata* L.), mediante el uso puestas consecutivas, en condiciones industriales de cultivo**

#### **2.1.1 Material biológico y caracteres**

Tres modelos diferentes de contribución de puesta masal fueron considerados en este estudio de acuerdo con el número de días consecutivos en los que se recogieron los huevos y se agruparon: un día (1D), dos días (2DL) y cuatro días (4 DL). Todos los lotes de puesta fueron incubados en las mismas condiciones y se cultivaron de manera similar como describen Roo *et al.* (2009). Los muestreos para características de crecimiento se llevaron a cabo de acuerdo con AquaExcel-ATOL (AquaExcel Proyecto, 2013) para el peso corporal (ATOL: 0000351), la longitud (ATOL: 0001658), el factor de condición (ATOL: 0001653) y la tasa de crecimiento específica (ATOL: 0001662).

##### *Modelo de desove de un día (1D)*

En este modelo, dos lotes de reproductores con diferente número de animales fueron evaluados: puestas pequeña y grande. La puesta pequeña, referida como 1DS, consistió en una puesta masal de un solo día generada por un stock de seis reproductores (4 machos: 2 hembras), establecidos en un mismo tanque del Parque Científico Tecnológico Marino de la Universidad de Las Palmas de Gran Canaria (PCTM, Gran Canaria, España). Se dispuso de tres stocks de reproductores iguales en cuanto a número de animales y proporción sexual, que fueron diferentes e independientes (PCTM<sub>1DS-1</sub>, PCTM<sub>1DS-2</sub>, PCTM<sub>1DS-3</sub>). Así, como el modelo 1DS consistió en un total de 18 reproductores, donde de cada stock se obtuvo un lote de huevos recogidos (sólo un día). La puesta grande (referida como 1DL), consistió en un tanque con 66 reproductores ( $\cong 2\text{♂} : 1\text{♀}$ ) en la empresa Tinamenor S.A. (San Vicente de la Barquera, Cantabria, España), del que sólo un lote de huevos de un solo día fue recogido y evaluado. Los lotes de los modelos 1DS y 1DL se cultivaron en las instalaciones del PCTM, en condiciones de producción industrial. Para los tres lotes de descendientes el modelo 1DS se tomaron muestras a los 194 días después de la eclosión (DPH) (45, 47 y 53

## RESUMEN ESPAÑOL

---

ejemplares para PCTM<sub>IDS-1</sub>, PCTM<sub>IDS-2</sub>, PCTM<sub>IDS-3</sub>, respectivamente), para estimar la contribución de los reproductores. Para el modelo 1DL, 200.000 huevos fueron enviados a una jaula situada en Playa de Vargas 2001 S.L. Company (PLV2001<sub>1DL</sub>, Gran Canaria, España), y se tomaron muestras a los 130 DPH. Además, una sub-muestra de 479 especímenes se retuvo en las instalaciones de engorde de PCTM (nombrado como PCTM<sub>1DL</sub>) para su posterior engorde, como se describe en Navarro *et al.* (2009). A los 509 DPH, los peces de PCTM<sub>1DL</sub> y PLV2001<sub>1DL</sub> (479 y 395 peces, respectivamente) fueron sacrificados, y caracterizados para crecimiento, y un trozo de aleta de cada pez se almacenó en etanol hasta su análisis.

### *Modelo de dos días de desove (2DL)*

Este modelo corresponde al diseño experimental explicado en Lee-Montero *et al.* (2015). En resumen, en este modelo, se recogieron y combinaron los lotes de huevos de dos días consecutivos provenientes de las puestas masales de tres stocks de reproductores diferentes e independientes. Los tres stocks de reproductores tuvieron diferente número de reproductores y proporción de sexos. Cada stock estuvo ubicada en diferentes localidades e instituciones españolas (una universidad pública y dos empresas privadas): PCTM en las Islas Canarias (PCTM<sub>2DL</sub>; n = 59, 1.8♂: 1♀), CULMASUR SA (CSUR<sub>2DL</sub>) en el sur de España (n = 99, 1♂: 1♀), y PISCIMAR SL (PMAR<sub>2DL</sub>) en la costa este de España (n = 48, 1♂: 1.2♀). Piezas de aletas de todos los reproductores se almacenaron en etanol hasta su análisis genético. La recogida de los huevos y la cría de larvas se sincronizaron en las instalaciones, y una muestra aleatoria de 1.400 animales se intercambiaron entre sí para constituir, desde el punto de vista genético, lotes homogéneos para ser evaluados. A los 179 DPH, los alevines se marcaron individualmente mediante el uso de *Passive Integrated Transponder* (PIT; Trovan Daimler-Benz) en la cavidad abdominal, según Navarro *et al.* (2006). El período de crecimiento se llevó a cabo en condiciones industriales en jaulas ubicadas en las Islas Canarias (PCTM<sub>2DL</sub>, CANEXMAR<sub>2DL</sub>), en estanques situados en el sur de España (PIMSA<sub>2DL</sub>), y en jaulas ubicadas en la costa del Mediterráneo (CULTIMAR<sub>2DL</sub> y Servicios Atuneros del Mediterráneo S.L.; SADM<sub>2DL</sub>). A tamaño de mercado, un total de 4.093 peces fueron analizados y evaluados para los caracteres de crecimiento.

### *Modelo de cuatro días de desove (4DL)*

En este modelo, los huevos de cuatro días consecutivos se obtuvieron a partir de reproductores del PCTM (PCTM<sub>4DL</sub>, n = 65), y del Instituto de Investigación y Formación

Agraria y Pesquera (IFAPA) en el sur de España (IFAPA<sub>4DL</sub>, n = 58). Ambos stocks de reproductores fueron compuestos por animales seleccionados para el crecimiento y la ausencia de deformaciones morfológicas, de entre los descendientes de F1 producidos por los reproductores del modelo 2DL. Muestras de aleta de todos los reproductores se conservaron en etanol hasta su análisis genético. La obtención de los lotes de huevos a partir de ambos stocks de reproductores fueron sincronizados, y posteriormente incubados y criados bajo condiciones de cultivo similares. Del mismo modo que para el modelo 2DL, una muestra aleatoria de 1.400 peces de cada centro de investigación se intercambiaron entre ellos, y una muestra se mantuvo en cada instalación o centro de investigación, para ser utilizados como pre-reproductores de la siguiente generación. Las muestras adicionales de los también fueron enviadas a empresas de engorde (ADSA<sub>4DL</sub> and PIMSA<sub>4DL</sub>). A la edad de sacrificio, un total de 1.944 peces fueron muestreados y evaluados para los caracteres de crecimiento, y se tomaron muestras de aleta caudal, y conservados en etanol para el análisis de pedigrí.

### 2.1.2 Genotipado y la asignación de parentesco

Para la asignación parental, el ADN se extrajo de la aleta caudal, previamente conservada en etanol absoluto, mediante el uso de dos métodos. Para el modelo 1DL, se utilizó el método de fenol-cloroformo (Sambrook *et al.* 1989), mientras que para las muestras de los modelos 1DS, 2DL y 4DL se utilizó el kit DNeasy (Nucleospin<sup>®</sup> 96 tissue, MACHEREY-NAGEL), mediante el uso de robot TECAN Freedom EVO (Tecan Schweiz AG, Suiza), y el software *Standard v2.5 Evowar<sup>®</sup>*, siguiendo las instrucciones del fabricante. El ADN se almacenó a -20°C en el tampón proporcionado hasta su uso. La cantidad y calidad de ADN se determinaron usando un espectrofotómetro NanoDrop v.3.7 8000 (Thermo Fisher Scientific) y carrera en gel de agarosa, respectivamente. Los reproductores y descendientes de los diferentes modelos se caracterizaron genéticamente utilizando dos múltiple de PCR de microsatélites diferentes, de acuerdo con el momento en que aquellos se habían desarrollado y realizado los experimentos. Por lo tanto, las muestras de modelo 1DL se analizaron con la múltiple RimA, siguiendo las condiciones descritas por Navarro *et al.* (2008); mientras que las muestras de los modelos 1DS, 2DL y 4DL se analizaron con la múltiple SMsa-1 PCR (Super Multiplex *Sparus aurata*), desarrollada por Lee-Montero *et al.* (2013), y siguiendo las condiciones descritas por estos autores. Los genotipos fueron estimados por el software *GENEMAPPER v.3.7* y utilizando los RimA-kit

## RESUMEN ESPAÑOL

---

y SMSal-kit creados por Navarro *et al.* (2008) y Lee-Montero *et al.* (2013), respectivamente. Las relaciones familiares entre los criadores y la descendencia se determinaron mediante el método de exclusión con el uso de software *VITASSIGN v8.2.1* (Vandeputte *et al.*, 2006), donde el género de los criadores se consideró como desconocido.

### **2.2 Estimación de parámetros genéticos de nuevos caracteres tecnológicos no invasivos, sus relaciones con caracteres biológicos esenciales e interacción genotipo-ambiente en jaulas y esteros en dorada (*Sparus aurata* L.)**

#### **2.2.1 Biological material**

En este estudio fueron estimados parámetros genéticos de la segunda generación del programa de selección genética PROGNSA (Afonso *et al.*, 2012), denominado y ejecutado como INNOTECCS (proyecto nacional español, Referencia: RTA2013-00023-C02).

**F0 (generación de partida):** esta fue construida a partir de lotes de reproductores comerciales y de centros de investigación, con diferentes números de reproductores y ratio sexual: Parque Científico Tecnológico Marino de la Universidad de Las Palmas de Gran Canaria (PCTM, Gran Canaria, España) en las Islas Canarias (n=59, 1,81♂:1♀), CULMASUR S.A. (CSUR) in Andalucía (n=99, 1♂:1♀), y PISCIMAR S.L. (PMAR) in Valencia (n=48, 1♂:1,23♀). Para producir la primera generación, todos los lotes fueron sincronizados para la liberación de huevos y la colección de dos puestas de días consecutivos. Los huevos fueron incubados simultáneamente en las instalaciones de los centros de investigación en acuicultura, a partir de tres regiones españolas: PCTM en las Islas Canarias, Instituto de Investigación y Formación Agraria y Pesquera (IFAPA) en Andalucía, y el Institut de Recerca i Tecnologia Agroalimentàries, (IRTA) en Cataluña.

**F1 (primera generación):** Las larvas fueron criadas en las condiciones descritas por Roo *et al.* (2009). A los 84 días post-eclosión, una muestra al azar de 1.400 peces fue intercambiada con los otros centros de investigación, incluyendo uno nuevo a partir de otra región: Instituto Murciano de Investigación y Desarrollo Agrario y Alimentario (IMIDA) en Murcia. A los 179 días post-eclosión, los alevines fueron individualmente marcados con *Passive Integrated Transponder* (PIT; Trovan Daimler-Benz), en cavidad abdominal, siguiendo el protocolo descrito por Navarro *et al.* (2006). Al mismo tiempo, un trozo de

aleta caudal fue tomado y conservado en etanol hasta que el ADN fue extraído para el análisis genético y la reconstrucción de la genealogía. Una muestra del resto de la población fue conservada en las instalaciones de engorde de cada centro de investigación, como potenciales pre-reproductores (de la segunda generación), mientras que los restantes peces fueron enviados a las empresas de engorde: CANEXMAR S.L. (CANEXMAR; Islas Canarias), PIM S.A. (PIMSA; Andalucía), CULTIMAR S.A. (Cataluña), and Servicios Atuneros del Mediterráneo S.L. (SADM; Murcia). A talla de mercado, 3.743 peces fueron sacrificados y analizados para el crecimiento, rendimiento y calidad del pez y de la carne. La reconstrucción de las relaciones de parentesco entre descendientes y sus reproductores fue realizada siguiendo las indicaciones descritas por Lee-Montero *et al.* (2013).

**F2 (segunda generación):** A partir de los pre-reproductores supervivientes de la F1 de los lotes del PCTM e IFAPA, se constituyeron dos lotes de reproductores de élite, uno por cada centro de investigación, para producir la segunda generación de peces compuestos por las familias con mayor índice genético que compromete la longitud y la ausencia de malformaciones corporales, después de la evaluación BLUP. Dos lotes de reproductores de control fueron seleccionados completamente al azar, para cada uno de los centros de investigación. El número de reproductores y ratio sexual fueron similares en ambos lotes de élite (PCTM, n= 65, 1♂:1,43♀, IFAPA, n=58, 1♂:1,42♀), y control (PCTM, n = 67, 1♂: 1♀; IFAPA, n= 60, 1♂:1,4♀). Como fue indicado anteriormente, estos lotes de reproductores fueron sincronizados para la liberación de huevos y la recolección de embriones a partir de puestas de cuatro días consecutivos, las cuales fueron incubadas al mismo tiempo y cultivadas en condiciones similares a las descritas en la generación F1. Similarmente, una muestra al azar de peces fueron conservados en las instalaciones de engorde de cada centro de investigación, como potenciales pre-reproductores de élite para constituir la tercera generación, y los peces restantes fueron transportados a las empresas colaboradoras y engordadoras de cada región (ADSA; Islas Canarias y PIM S.A. in Andalucía).

### 2-2-2 Análisis de caracteres

A la talla de cosecha (700 dpe), una muestra de peces del PCTM (56 peces), ADSA (1.034 peces) y PIMSA (589 peces) fue sacrificada y medida para caracteres de crecimiento, carcasa y calidad del pez y de la carne. Los lotes de reproductores que permanecieron en los centros de investigación (464 en el PCTM y 336 en el IFAPA) también fueron muestreados

## RESUMEN ESPAÑOL

---

para los caracteres de crecimiento. A esta edad, algunos machos fueron fluyentes. Los caracteres fueron caracterizados de acuerdo con las metodologías estandarizadas definidas en AQUAEXCEL-ATOL (AQUAEXCEL project, 2013). El factor de condición (CF) fue calculado de acuerdo con el protocolo ATOL:0001653. Las deformidades fueron visualizadas mediante observación directa (ATOL:0000087). La tasa específica de crecimiento se utilizó el protocolo ATOL:0001662. Para el porcentaje de lípidos en el músculo fue utilizado el Distell Fish Fatmeter - FFM (Distell.com, West Lothian, Escocia), realizando cuatro lecturas, dos a cada lado del pez. Entonces, las vísceras fueron removidas y el peso de la canal fue registrado (ATOL:0001057), y expresado como porcentaje del peso corporal (porcentaje canal, ATOL:0000548). A los peces se les quitó manualmente la piel, y fileteados sin incluir la parte superior o nuca ni la zona ventral. Ambos filetes se pesaron juntos. Filetes se envasaron al vacío y se congelaron a -20°C hasta el análisis de la composición de la carne, para el que se homogeneizaron los filetes y se analizaron por el método indirecto de la espectroscopia de infrarrojo cercano (Espectroscopia de infrarrojo cercano, NIR) usando el equipo de laboratorio FOODSCAN (FOSS, Dinamarca) para determinar el contenido en proteínas, humedad y lípidos, como un porcentaje del músculo fresco. Cada pez fue fotografiado con una cámara digital, en vista lateral, en un cuarto oscuro con luz controlada, siguiendo las indicaciones dadas por Navarro *et al.* (2016). Posteriormente, se analizaron todas las imágenes, de una manera estandarizada y automática mediante la aplicación del software de análisis de imagen IMAFISH\_ML, desarrollado en MatLab v.7.5 (TheMath -Obras Inc, Massachusetts, EE.UU.) (Navarro *et al.*, 2016). Todas las características se muestran en la Tabla 3-1, y una imagen del pez donde se indican las medidas de longitud y altura, representadas en la figura 3-1.

### 2.2.3 Genotipado y asignación familiar

El ADN se extrajo a partir de un fragmento de la aleta caudal conservado en 1 ml de etanol absoluto mediante el uso de un kit DNeasy NucleoSpin<sup>®</sup> 96 para tejido (MACHEREY-NAGEL), usando un robot TECAN (Tecan Schweiz AG, Suiza), y el programa Freedom Evowar<sup>®</sup> Standard v2.5, siguiendo las instrucciones del fabricante. El ADN extraído se almacenó a -20 ° C en el tampón proporcionado hasta su uso. La cantidad y calidad del ADN se determinaron usando un espectrofotómetro NanoDrop 8000 v.3.7 (Thermo Fisher Scientific), y por gel de agarosa al 1% a 10 v / cm. Todos los reproductores y la descendencia se caracterizaron genéticamente mediante la múltiple SMsa-1 de PCR

(Super Multiplex *Sparus aurata*), desarrollada por Lee-Montero *et al.* (2013) que contiene 11 marcadores microsatélites específicos. Los genotipos fueron determinados por el programa Genemapper v.3.7, y utilizando el kit bin diseñado (kit-SMsa1). Las relaciones familiares entre los reproductores y la descendencia se determinaron mediante el método de exclusión con el uso de programa VITASSIGN (v8.2.1) (Vandeputte *et al.*, 2006), teniendo en cuenta el género de los reproductores como desconocido.

#### **2.2.4 Análisis de datos**

Antes de realizar las estimaciones de los parámetros genéticos, se analizaron todos los datos cuantitativos para la normalidad y homogeneidad de varianzas. Los efectos de los factores fijos (seguimiento, sistema de cultivo, origen), fueron estudiados mediante un Modelo lineal general utilizando el programa SPSS v.18 (SPSS, Chicago, IL, EE.UU.). Las componentes de varianza de todos los caracteres considerados en este estudio, y para obtener parámetros genéticos (heredabilidades y correlaciones), se estimaron por el método Máxima Probabilidad Restringida, mediante el siguiente modelo,

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

donde,  $y$  contiene los datos registrados en los caracteres estudiados,  $\beta$  los efectos fijos (seguimiento, sistema de cultivo, origen),  $u$  el efecto de los animales al azar, y  $e$  es el error. Interacciones genotipo-ambiente (GxE), al tamaño de cosecha (700 días), se estimaron mediante la correlación genética entre dos instalaciones (ADSA y PIMSA), considerando el rasgo particular de interés como un rasgo diferente en cada instalación (Falconer y Mackay, 1996). Todas las estimaciones genéticas se llevaron a cabo utilizando programa VCE (v 6.0) (Neumaier and Groeneveld, 1998; Groeneveld *et al.*, 2010).

Para clasificar la magnitud de las heredabilidades estimadas, se siguió el proceso de clasificación sugerido por Cardelino y Rovira (1987) como: baja (0,05-0,15), media (0,20-0,40), alta (0,45-0,60) y muy alta (> 0,65). La magnitud de la correlación se estableció siguiendo la clasificación indicada por Navarro *et al.* (2009a) como: baja (0-0,40), media (0,45-0,55) y alta (0,60-1), sin tener en cuenta si es positivo o negativo.

### 3. Resultados y discusión

#### 3.1 Optimización de la estructura familiar factorial en dorada (*Sparus aurata* L.), mediante el uso puestas consecutivas, en condiciones industriales de cultivo

##### 3.1.1 Fenotipado

Todos los modelos de puestas masales de este estudio se evaluaron en términos del número total de los reproductores (TB), y de reproductores que contribuyeron a la descendencia (CB). En todos los modelos, los descendientes se criaron hasta que el tamaño comercial a excepción de los pertenecientes al modelo 1DS, donde los peces fueron sacrificados a los 194 DPH. Los resultados fenotípicos para las características de crecimiento (peso, longitud, factor de condición y SGR) se muestran en la Tabla 2-1. Para el modelo 1D, sus tres lotes cultivados (PCTM<sub>1DS-1</sub>, PCTM<sub>1DS-2</sub>, PCTM<sub>1DS-3</sub>) mostraron valores similares en cuanto a características de crecimiento. En el modelo 1DL, los peces cultivados a PLV2001<sub>1DL</sub> (jaula oceánica) mostraron valores de crecimiento más altos que los cultivados en PCTM<sub>1DL</sub> (tanque), un 33% y 9% para el peso y la longitud, respectivamente. En el modelo 2DL, los peces criados en PCTM<sub>2DL</sub> (tanque) mostraron los valores más altos, y SADM<sub>2DL</sub> (jaula oceánica) los más bajos, para todas las variables de crecimiento. En el modelo 4DL, los peces cultivados en PCTM<sub>4DL</sub> e IFAPA<sub>4DL</sub> (tanque), mostraron los valores más altos para el peso y la longitud que los cultivados en ADSA<sub>4DL</sub> (jaula oceánica) y PIMSA<sub>4DL</sub> (estero). Los peces de PIMSA<sub>4DL</sub> mostraron el valor más bajo de SGR. Se observaron correlaciones fenotípicas altas entre el peso corporal y la longitud con los valores SGR,  $0,81 \pm 0,06$  como promedio, dentro de los clases de peso de 1DS y 2-4DL. Las correlaciones entre el peso y el SGR ( $r_{1DS-Peso/SGR}=0.87; r_{2-4DL-Peso/SGR}=0.66$ ) fueron más bajas que entre la longitud y el SGR ( $r_{1DS-longitud/SGR}=0.98; r_{2-4DL-longitud/SGR}=0.72$ ), independientemente de la clase de peso de los peces. Como era de esperar, estas correlaciones fueron más altas, como promedio, en los juveniles (0,92 en 1DS) que en los adultos (0,69 en 2-4DL). En consecuencia, las comparaciones de SGR entre diferentes categorías de peso (1DS, 1DL y 2-4DL) no fueron posibles. Dentro de la misma clase de peso (2DL y 4DL), el SGR promedio fue un 18% mayor en el modelo 4DL que en el modelo 2DL ( $0,72 \pm 0,04$  y  $0,61 \pm 0,04$ , respectivamente).

Los datos de crecimiento previstos en el modelo 4DL indican que el peso medio a la cosecha fue mayor en los peces criados en tanque (PCTM<sub>4DL</sub>, IFAPA<sub>4DL</sub>) que en jaulas oceánicas (ADSA<sub>4DL</sub>) o esteros (PIMSA<sub>4DL</sub>). Las diferencias en crecimiento de los peces entre instalaciones, tanque (PCTM<sub>4DL</sub>) frente a jaula (ADSA<sub>4DL</sub>) en las Islas Canarias pueden explicarse al menos parcialmente por el tipo de sistemas de alimentación (auto-alimentador vs manual, respectivamente) y la temperatura y la densidad, que eran similares a los descritos por Lee-Montero *et al.* (2015). Otro factor importante es la frecuencia de la alimentación, que es claramente de mayor intensidad en el cultivo basado en tanques (PCTM<sub>4DL</sub>) que en jaulas oceánicas (ADSA<sub>4DL</sub>), donde, al mismo tiempo, el mal tiempo juega un papel esencial en los procesos de alimentación, disminuyendo los períodos de alimentación. Del mismo modo, las diferencias entre el cultivo en tanques (IFAPA<sub>4DL</sub>) y en esteros (PIMSA<sub>4DL</sub>), en el sur de España, se pueden explicar por las condiciones de crianza, como son las dimensiones (5-10 m<sup>3</sup> y 2.000 m<sup>3</sup>, respectivamente), la calidad del agua (filtrada por bombeado y estero, respectivamente), y las características físico-químicas (pequeñas y grandes fluctuaciones de temperatura o salinidad para IFAPA y PIMSA, respectivamente). Por otra parte, en el estero es más difícil de ajustar las cantidades de alimento a la biomasa existente. A pesar de estas diferencias de crecimiento, estos resultados están en concordancia con los descritos previamente en las mismas regiones españolas (Ginés *et al.*, 2004; Navarro *et al.*, 2009; García-Celdrán *et al.*, 2015a; Lee-Montero *et al.*, 2015).

En cuanto al SGR, se observaron diferencias significativas relevantes entre los ejemplares cultivados bajo el modelo 4DL versus el modelo 2DL. Los animales de los modelos de 4DL y 2DL pertenecen al mismo programa de mejora genética, PROGENSEA<sup>®</sup> (Afonso *et al.*, 2012), en el que la presión de selección es llevada a cabo a través de las características de crecimiento y la ausencia de malformaciones (García-Celdrán *et al.*, 2015a; Lee-Montero *et al.*, 2015). Las muestras de descendientes de los modelos 2DL y 4DL pertenecen a dos generaciones consecutivas de selección, (F1 y F2, respectivamente). El progreso genético obtenido para el SGR fue similar al obtenido en otros programas de cría comercial de dorada como en CULMAREX (Fernandes *et al.*, 2010), NIREUS (Thorland *et al.*, 2015) y ANDROMEDA (Kostas Tzokas, comunicación personal).

### 3.1.2 Genotipado y la asignación de parentesco

La asignación parental de los descendientes de los modelos 1DS y 1DL fue del 100%, a un solo par de padres. Para el modelo 2DL, se obtuvo el 100% de la asignación a un solo par de padres en PCTM y PMAR. Para las muestras de CSUR, sólo el 90% fue asignado a un par de padres y el 10% restante a dos posibles parejas reproductoras. Aun así, no se excluyeron del análisis y fueron consideradas como familias de medios hermanos (maternas o paternas). Para las muestras del modelo 4DL, el porcentaje medio de asignación a un solo par de padres fue del 87,5% para el PCTM<sub>4DL</sub>, ADSA<sub>4DL</sub>, IFAPA<sub>4DL</sub> y PIMSA<sub>4DL</sub>. El 12,5% restante fue asignado a dos posibles parejas reproductoras y se les mantuvo en el análisis como familias de medios hermanos (maternas o paternas). Después de comprobar los genotipos, se identificaron los alelos nulos y fueron corregidos en la matriz de parentesco.

En este estudio se utilizó la múltiple de PCR SMsa-1 de microsatélites (Lee-Montero *et al.*, 2013), confirmado a la luz de los resultados su alta eficiencia para reconstruir las asignaciones del parentesco con éxito comprendido entre el 87,5 - 100% de forma inequívoca, al menos a un solo par de padres y del 100% de éxito para al menos un padre, bajo diferentes escenarios de puesta masal (pequeñas y grandes de uno, dos o cuatro días consecutivos). Dicha eficiencia fue mantenida a pesar del análisis de descendientes provenientes de la puesta masal del modelo 4DL, donde los peces provenían de cuatro desoves consecutivos, poseer un 8% más de familias que el modelo 2DL de dos desoves masales consecutivos (2DL; Lee-Montero *et al.*, 2015), y un 23% más de familias que el modelo de sólo un desove masal (1DL; Navarro *et al.*, 2009a, b). Éxitos de asignación similares del 85% al 100% han sido descritos mediante el uso de reacciones múltiples de microsatélites en especies otras especies comerciales (Fishback *et al.*, 2002; Saillant *et al.*, 2006, 2007; Dupont-Nivet *et al.*, 2008). Con puestas de cuatro días consecutivos, Batargias *et al.* (2015) asignó el parentesco con una eficiencia del 95,8% en una muestra de descendientes de dorada con una reacción múltiple de PCR de marcadores microsatélites, si bien los autores no especifican si fue a una sola pareja de padres o al menos un reproductor. Mediante el uso de reacciones individuales en dorada también han sido obtenidos asignaciones del 85% en puestas masales (Castro *et al.*, 2008; Fernandes *et al.*, 2010), pero a mayores costes de análisis, a la par que dichos autores tampoco indican si fue a una sola pareja de padres o al menos un reproductor.

### 3.1.3 Contribuciones familiares

El número total de los reproductores, el número de reproductores que contribuyen a la descendencia de cada stock, la proporción sexual, y el número las familias de hermanos completos (FS) y de medios hermanos (HS), se muestran en la Tabla 2-2. Para el modelo 1DS, en todos los stocks todos los reproductores contribuyeron a la descendencia, a excepción de un solo reproductor perteneciente al stock  $PCTM_{1DS-3}$ , es decir, que un total de 17 reproductores (94%) de los 18 en total que formaron los tres stocks, para producir un promedio de 7 familias de FS y 5.3 familias HS por lote de descendientes. En total, se formaron 21 familias de FS y 16 familias de HS (maternas o paternas; 76% del total). Para el modelo 1DL, sólo 28 peces (17 hembras y 11 machos; 42%), de 66 reproductores, contribuyeron a la descendencia. Se identificaron un total de 89 familias de FS y 24 familias de HS (8 paternas y 16 maternas; 27% del total de familias de FS). Para el modelo 2DL, el número total de los reproductores contribuyentes a la progenie fue de 139 (67% de los reproductores), 50 en  $PCTM_{2DL}$  (85%), 78 en  $CSUR_{2DL}$  (79%), y 11 en  $PMAR_{2DL}$  (23%). El número total de familias de FS y de HS fueron 297 y 105, respectivamente (52 paternas y 53 maternas; el 35% de las familias de FS). En el modelo 4DL, el 67% de los reproductores (40 hembras y 43 machos; 78% en  $PCTM_{4DL}$  y el 55% en  $IFAPA_{4DL}$ ) contribuyeron a producir un total de 201 familias de FS. El número total de familias de HS fue de 59 (32 paternas y 27 maternas; el 29% de las familias de FS).

El censo efectivo de la población, los porcentajes de los reproductores contribuyentes, el número de familias por reproductor, número de descendientes por familia y el coeficiente de variación en cada modelo de puesta masal, se muestran en la Tabla 2-3. Como se indica, hay una gran variación en los porcentajes de contribución para cada reproductor, los que implica una gran variación en el número de familias y tamaño de la familia. Los porcentajes de los reproductores que contribuyen a la descendencia de los modelos 2DL y 4DL fueron similares, y claramente más alto que el modelo 1DL. Sin embargo, el número total de familias por reproductor mostró una correlación positiva con el número de días consecutivos de desove ( $r = 0,95$ ), siendo el modelo 4DL más alto que los otros modelos probados, 2DL y 1DL, en un 14% y 23%, respectivamente.

## RESUMEN ESPAÑOL

---

Las contribuciones familiares bajo el modelo 2DL (PCTM<sub>2DL</sub>, CSUR<sub>2DL</sub>) y el modelo 4DL (PCTM<sub>4DL</sub>, IFAPA<sub>4DL</sub>), se muestran en las Figuras 2-1, 2-2, 2-3 y 2-4, respectivamente. Como se muestra, el número de familias fue mayor en PCTM<sub>4DL</sub> que PCTM<sub>2DL</sub>, con un mayor número de contribuciones familiares para los machos que las hembras. Por el contrario, el número de contribuciones en CSUR<sub>2DL</sub> fue mayor que en IFAPA<sub>4DL</sub>.

En este estudio, los mejores resultados en términos de contribución de los reproductores y la representación de la familia fueron encontrados en el modelo 1DS (97%), que utiliza el menor número de reproductores (seis en cada uno de los stocks PCTM<sub>1DS-1</sub>, PCTM<sub>1DS-2</sub> y PCTM<sub>1DS-3</sub>). En todos los stocks de reproductores, todas las hembras se aparearon con todos los machos menores de puesta masal (una estructura familiar factorial perfecta), excepto en PCTM<sub>1DS-3</sub> reproductores, donde sólo un macho (M4) no se apareó con las hembras. A pequeña escala, es mucho más fácil la interacción entre todos los reproductores que en mayor escala, debido a factores de manejo que pueden modificar las interacciones y comportamiento de los peces en los tanques incluidas las posiciones dominantes (Knight, 1985). Estos resultados están de acuerdo con Sonesson y Nielsen (2012), quien estimó que la tasa de endogamia disminuye y aumenta la ganancia genética, como se esperaba, al aumentar del número de contribuyentes machos y hembras. En los modelos de puestas masales a gran escala, el número total de familias producidas (corregido por el número total de reproductores) se correlaciona positivamente con el número de días consecutivos de huevos por lotes agrupados. Por lo tanto, el modelo 2DL era claramente mejor que 1DL, mientras 4DL presentó el mejor comportamiento en términos de número total de familias. En cuanto al número de descendiente por tipo de familia (FS y HS), los valores aumentaron de 1DL a 2DL. Para el modelo 4DL, parecía disminuir, pero si se corrigen estos valores, según el número de descendientes muestreados en 2DL, que sería más alto (Tabla 2-3). Comparación entre PCTM<sub>2DL</sub> y PCTM<sub>4DL</sub>, mostró claramente un mayor número de reproductores que contribuyen a la descendiente, cuando el número de días consecutivos aumentó (Fig. 2-1 y 2-2). Esta tendencia no fue corroborada por las instalaciones CSUR<sub>2DL</sub> e IFAPA<sub>4DL</sub>. Sin embargo, se debe considerar que CSUR<sub>2DL</sub> tenía un 71% más de reproductores que IFAPA<sub>4DL</sub>. Debido a ambos escenarios (PCTM<sub>2DL</sub> - PCTM<sub>4DL</sub> y CSUR<sub>2DL</sub> - IFAPA<sub>4DL</sub>), el porcentaje promedio final de reproductores que contribuyen a la descendencia fueron similares entre los modelos 2DL y 4DL, probablemente porque durante 2 ó 4 días los reproductores que están bajo actividad sexual son los mismos. En cualquier caso, parece que un alto número de reproductores y de puestas masales consecutivas, al

mismo tiempo, podría aumentar el número de reproductores que contribuyen a la descendencia, con un impacto positivo en la ganancia genética (Sonesson y Nielsen 2012).

Los resultados de este estudio, llevado a cabo en el marco del proyecto INNOTECCS (nombre de la segunda generación de PROGNSA<sup>®</sup>), están en concordancia con este último régimen. Es decir, que apoya la idea de que un programa de mejora genética también es posible entre los pequeños stocks de dorada cuando se coordinan y comparten información (fenotípica y genética), acerca de sus cientos de reproductores estructurados (Afonso *et al.*, 2012). Cuando se seleccionan cientos de reproductores, entre miles de candidatos seleccionados y evaluados previamente, la tasa de endogamia y la ganancia genética pueden ser maximizadas (Sonesson *et al.*, 2012).

Los resultados de este estudio estuvieron en concordancia con el censo efectivo de la población esperada por generación, que fueron superiores a un centenar en los modelos 2DL y 4DL (dos generaciones consecutivas del programa de mejora PROGNSA). Ambas estimaciones están de acuerdo con Gjerde (1993) y Jørstad y Nævdal (1996), quienes concluyeron que un  $N_e$  de 100 por generación es suficiente para minimizar la endogamia en los programas de mejora en salmónidos.

En este estudio, basado en puestas masales, el número de reproductores que contribuye se incrementa desde las dos puestas consecutivas, y por lo tanto un mayor  $N_e$ . Por otra parte, una estrategia alternativa para mejorar aún más la contribución a escala industrial, podría ser la utilización de dos siembras consecutivas, cada una constituida con puestas de cuatro días consecutivos (modelo 4DL), distantes en al menos un mes de diferencia, donde se supone que diferentes grupos de reproductores estarían bajo condiciones de actividad sexual, sin efecto alguno sobre los parámetros de calidad de la puesta (Fernández -Palacios, 2005). Brown *et al.* (2005) encontraron que el censo efectivo de la población, basado en el muestreo de una sola puesta masal, era moderadamente bajo, debido al número de reproductores contribuyentes frente al número de reproductores fundadores del stock. García-Celdrán *et al.* (2016), describieron resultados similares en tres stocks de reproductores independientes de dorada, pertenecientes a los reproductores originales utilizados para establecer la población base del programa de selección genética PROGNSA en generaciones posteriores, y donde las diferencias en el número de reproductores contribuyentes y proporción de sexos desequilibrada, afectaron a la tasa de endogamia esperada. Sin embargo, cuando se conoce la matriz de datos de la genealogía en

puestas masales, y se combina con la selección de los padres optimizada mediante evaluación BLUP y el apareamiento con consanguinidad mínima, es posible gestionar la endogamia lo largo de generaciones dentro de los programas de mejora genética pequeños de 30-40 machos y hembras 30-40 (Hely *et al.*, 2013). Por otra parte, el control del parentesco es posible en los programas de mejora genética, es decir, que la convergencia entre los valores esperados y observados para las tasas de endogamia sea muy similar, cuando se utiliza la matriz de parentesco por pedigrí tanto para el control de la consanguinidad como de la evaluación BLUP de los candidatos (Sonesson *et al.*, 2012).

### **3.2 Estimación de parámetros genéticos de nuevos caracteres tecnológicos no invasivos, sus relaciones con caracteres biológicos esenciales e interacción genotipo-ambiente en jaulas y esteros en dorada (*Sparus aurata* L.)**

#### **3.2.1 Genotipado y asignación de parentesco**

El uso de la múltiple SMsa1de PCR utilizando el método de exclusión, con un máximo de dos errores tolerados, la asignación parental tuvo un éxito del 87% para los descendientes cultivados en jaula en las Islas Canarias, y el 88% en el estero en Andalucía. El resto de los descendientes (13% y 12% de la jaula y del estero, respectivamente), fueron asignados a dos posibles parejas reproductoras, pero no fueron excluidos de los análisis genéticos, y fueron incluidos en la matriz de relaciones como “un solo padre conocido”. En cuanto a la contribución de los reproductores, de los reproductores totales de élite (123), 83 reproductores (67%), 40 hembras y 43 machos, contribuyeron a producir un total de 201 familias de hermanos completos, y 59 familias de medios hermanos (32 paternas y 27 maternas). A partir de los 127 reproductores de control, 83 reproductores (65%), 42 hembras y 41 machos, contribuyeron a producir un total de 123 familias de hermanos completos, y 50 familias de medios hermanos (27 paternas y 23 maternas).

Existe un creciente interés por el desarrollo de programas de mejora genética en dorada, particularmente por la facilidad para caracterizar algunos caracteres importantes combinados con la reconstrucción de pedigrí basada en marcadores genéticos. Estas herramientas son esenciales en los programas cuantitativos en los que la contribución de los reproductores es desconocida y la genealogía sólo se puede inferir a partir del análisis de marcadores microsatélites (Navarro *et al.*, 2008, 2009a). Los programas de reproducción en

los sistemas de producción de dorada están diseñados principalmente bajo el desove masal (Chavanne *et al.*, 2016; Janssen *et al.*, 2016). Los desoves con un alto número de huevos son deseables con el fin de obtener larvas de alta calidad desde el punto de vista de la gestión, pero un alto número de reproductores contributivos y de crías por reproductor es relevante desde el punto de vista genético. En este estudio, una alta asignación a un solo par de los padres se ha obtenido a partir del desove masal de diferentes lotes de reproductores, con *background* genético similar. Navarro *et al.* (2009b), utilizando únicamente la puesta de un sólo día, asignaron el 100% de la descendencia a parejas individuales. Lee-Montero *et al.* (2015), utilizando puestas provenientes de dos días consecutivos, describieron un éxito del 100% en dos lotes de reproductores, y un 90% en tercer lote de reproductores, pero este último tuvo un número de reproductores muy superior a los anteriores (87%). En este estudio, el uso de puestas de cuatro días consecutivos (con más familias que Navarro *et al.*, 2009b, y Lee-Montero *et al.*, 2015), se obtuvo un 87,5% de asignaciones a un par con un solo padre. Este resultado es corroborado por los resultados preliminares obtenidos para submuestra de 204 descendientes criados hasta el tamaño de un kilo para ser cosechados, donde se obtuvo un 91% para la asignación de los padres a parejas individuales con un solo padre (datos no mostrados). Por lo tanto, existe una correlación negativa entre el número de familias y el éxito de asignación de los padres para una pareja con un solo padre. Sin embargo, la asignación a un par con un solo padre o dos pares de un solo padre fue suficiente para la reconstrucción de la matriz de parentesco, y las estimaciones de parámetros genéticos como demostrado previamente (Lee-Montero, 2012; García-Celdrán *et al.*, 2015a,b,c; Lee-Montero *et al.*, 2015). Además, la selección de los animales requiere controlar la tasa de endogamia y que un número elevado y homogéneo de reproductores contribuyan con los descendientes necesarios (Falconer y Mackay, 1996). Este escenario se puede resolver añadiendo una segunda, específica y altamente eficiente reacción múltiple con nuevos marcadores que pueden aumentar el poder de exclusión para la asignación, ya existente (SMsa2), puesta a punto y con los mismos rasgos que la SMsa1 (Lee-Montero *et al.*, 2013). Sin embargo, un equilibrio entre el beneficio y el costo debe ser considerado debido a los costos del genotipo.

### 3.2.2 Fenotipado

Los resultados fenotípicos para el crecimiento (peso corporal, longitud forcal y factor de condición), la carcasa (rendimiento de la canal y peso del filete), la composición corporal

## RESUMEN ESPAÑOL

---

(proteína, grasa y humedad en el músculo), y los caracteres tecnológicos no invasivos en jaula oceánica y en estero se muestran en la Tabla 3-2. Los peces cultivados en estero mostraron valores más altos que los mostrados en jaula oceánica para la mayoría de los caracteres de crecimiento, carcasa, composición de la carne y caracteres tecnológicos no invasivos que las cultivadas en jaula, excepto para los caracteres del porcentaje de la canal, el SGR y la humedad. Las características de crecimiento, tales como la conversión de alimentos, factor de condición y la tasa de crecimiento específico son los rasgos económicos más importantes en la producción animal, ya que están directamente relacionadas con los costes de producción (Jover, 2007). Sin embargo, la conversión de los alimentos es difícil de medir en condiciones industriales y selección indirecta utilizando el peso o la longitud a diferentes edades son adecuadas (Kinghorn, 1983). De hecho, los valores fenotípicos para características de crecimiento obtenidos en este estudio coinciden con los descritos por Navarro et al. (2009a) y Lee-Montero et al. (2015). Curiosamente, los valores de crecimiento más bajos se registraron en los peces criados en las Islas Canarias, posiblemente debido a la ubicación de la jaula, en la que la alimentación era a veces difícil debido a las condiciones del entorno. Sin embargo, el sistema de esteros en condiciones semi-intensiva utiliza alimentos de origen satisfactoria tanto piensos naturales (gambas) y los pellets comerciales. De hecho, una muestra aleatoria de pescado cultivado en las instalaciones de PCTM, y se alimenta regularmente en condiciones controladas, mostró por la misma edad un 51% más que sus hermanos en las jaulas oceánicas. Estos datos demuestran la importancia de la optimización de las condiciones de producción para obtener el máximo rendimiento con base genética similar.

Los caracteres de rendimiento son importantes desde el punto de vista económico, y muy apreciados en la industria de la acuicultura (Neira et al., 2004). Los valores del porcentaje del peso canal obtenidos en este estudio fueron altos, y consistentes con los obtenidos por otros autores en dorada, también criados en la misma zona geográfica (Ginés, 1997; Oliva, 2007;. Navarro *et al*, 2009a), estando relacionado con el tamaño del pez. De hecho, utilizando sólo las poblaciones de peces criados en las Islas Canarias (para evitar algunos efectos), se han detectado los valores más altos (95,01%) en los peces de más peso (946,27 g) en una muestra de peces genéticamente relacionados con la población del presente estudio (datos no mostrados). En cuanto al peso filete, los resultados del presente estudio fueron bajos, especialmente en aquellos peces criados en las Islas Canarias, debido al bajo peso de los peces al sacrificio, lo cual fue mencionado y explicado anteriormente. De

hecho, existe una alta correlación entre el peso y el peso filete (0,99), cuando los peces de este estudio se comparan con otras poblaciones de peces cultivados en la misma región (Navarro *et al.*, 2009a; Lee-Montero, 2012). Sin embargo, en relación con el peso filete en %, los resultados de este estudio, que fueron del 31,1% y el 34,2% en jaula y el estero, respectivamente (media de 32,3%), están en concordancia con Navarro *et al.* (2009a), 35,4%, y Lee-Montero (2012), 37,8%. De este modo, se estimó una alta correlación de 0,79, entre el peso del pez y peso del filete en % al peso, cuando se consideraron todos los datos de la misma región.

Hoy en día, existe un interés creciente en los caracteres de calidad, sobre todo por los beneficios que tienen para la salud humana, principalmente debido al efecto protector de los lípidos de pescado contra las enfermedades cardiovasculares. Para determinar estas características, la composición de la carne en su contenido en proteína, lípidos y humedad en el músculo fueron estudiados (Gjedrem, 1997). En el cultivo de dorada, los valores del porcentaje de grasa descrito en estudios previos fueron muy variables, del 2 al 11%, e inversamente proporcional a la humedad, de entre 74 y 68% (Robaina *et al.*, 1997; Flos *et al.*, 2002; Ginés *et al.*, 2004; Grigorakis, 2007; Navarro *et al.*, 2009b; Lee-Montero, 2012). Estos valores son consistentes con los resultados obtenidos en este estudio. Sin embargo, la comparación de las poblaciones de dorada cultivadas de la misma forma y en la misma ubicación (Ginés *et al.*, 2004; Navarro *et al.*, 2009b; Lee-Montero, 2012), incluyendo las del presente estudio, se puede apreciar las diferencias en los valores medios, según la metodología utilizada; 9,47% para la metodología de la FFM (Lee-Montero, 2012, y este estudio), 7,78% para la metodología química (Ginés *et al.*, 2004; Navarro *et al.*, 2009b), y 6,37% para la metodología NIR (Lee-Montero, 2012, y este estudio). Por lo tanto, parece que la metodología NIR estima valores más próximos a la metodología química (Métodos Oficiales de Análisis; AOAC, 1990) que la metodología FFM, aunque otras causas como la composición del alimento no pueden ser descartadas. Fish Fat Meter (FFM), es un método indirecto (no invasivo, rápido, práctico, fácil y económico) que utiliza la relación entre el contenido de agua y el contenido de grasa para estimar el porcentaje de grasa en el músculo (Nielsen *et al.*, 2005). Las estimas de este método fueron mayores en porcentaje de grasa para que el método NIR, cuando ambos métodos de medida se realizaron sobre las mismas muestras, algo también observado por Lee-Montero (2012), 97% superior, y en este estudio, un 42% más alto. Del mismo modo, para el porcentaje de proteínas, fueron similares a los descritos por Ginés *et al.* (2004) y Lee-Montero (2012). Por otra parte, la comparación de

los valores para los métodos de media químico y NIR, para el contenido de proteína fueron exactamente los mismos, 21,6%.

La apariencia externa de la dorada refleja en cierta medida de su historia de vida, por ejemplo, los estudios biométricos en los especímenes silvestres muestran diferencias significativas con respecto a los individuos criados en sistemas intensivos, es decir, son más cortos, más anchos y más altos (Grigorakis, 2007). Pero cuando se necesita una matriz de datos grande, como es el caso de la mejora genética, los métodos manuales son propensos a un mayor número de errores y se prefieren métodos automáticos. Por lo tanto, la inspección visual automatizada en la industria alimentaria tiene ventajas importantes desde el punto de vista de la relación coste-eficacia, la coherencia, la velocidad y la precisión (Brosnan y Sun, 2004). Los caracteres morfológicos definidos y medidos en el presente estudio, son los primeros descritos para dorada. Las estimaciones de las variables morfológicas por el programa IMAFISH mostraron una variación menor que los métodos manuales, como es el caso de la longitud del pez, cuando la determinación de la longitud estándar por IMAFISH (SL) mostró un coeficiente de variación inferior, 11%, que el método manual.

### 3.2.3 Heredabilidades y correlaciones

Las estimaciones de heredabilidad para cada carácter, y las correlaciones genéticas y fenotípicas entre caracteres se muestran en la Tabla 3-3. Las heredabilidades oscilaron entre 0,09 y 0,25 para los caracteres de crecimiento, de 0,04 a 0,35 para caracteres de la canal, desde 0,08 a 0,27 para caracteres de la composición corporal, y de 0,04 a 0,40 para los caracteres tecnológicos no invasivos.

Los caracteres de crecimiento (peso y longitud) dependen de factores relacionados con la alimentación y condiciones de cría en gran medida pero, por lo general, tienen una determinación genética media-alta en la mayoría de los animales de granja (Cardellino y Rovira, 1987), donde la variación genética aditiva juega un papel importante. En dorada, Knibb *et al.* (1997) estimaron que la heredabilidad realizada para el peso a talla cosecha, osciló entre el media (para selección ascendente) y alta (para selección descendente), después de una sola generación de selección divergente frente a una población de control. Navarro *et al.* (2009a), en un lote industrial engordado en dos instalaciones, describieron valores intermedios de heredabilidad para el peso y la longitud, desde alevines hasta adulto. Lee-Montero (2012), también para un lote industrial criado en una sola localidad (las Islas

Canarias), que pertenece a la primera generación del programa de mejora PROGENSA, y para el mismo rango de pesos, describió valores de alta y baja heredabilidad para alevines y adultos, respectivamente. Del mismo modo, Fernandes *et al.* (2010) describieron un valor de heredabilidad alta (0,45), en adultos, para un lote industrial cultivado en una sola instalación. Cuando una gran cantidad de peces son constituidos con las mismas familias y se hacen crecer en diferentes localidades a lo largo de la costa española, las estimaciones de heredabilidad al estadio de adulto fueron más bajas, es decir, valores medios (Lee-Montero, 2012). García-Celdrán *et al.* (2015c), también en un lote industrial, encontraron valores heredabilidad medios y bajos para el peso y la longitud, en alevines y adultos (a talla cosecha). Los datos del presente estudio, que pertenecen a la segunda generación de PROGENSA y donde la presión de selección se llevó a cabo a través del peso a talla cosecha en dos localidades diferentes, mostraron heredabilidad medias similares y consistentes. Esto está en concordancia con el control de la tasa de la endogamia de ambas generaciones de PROGENSA, porque los tamaños de población efectiva fueron similares (157 y 155, para las generaciones primera y segunda, respectivamente). Para la compacidad o factor de condición (CF), la heredabilidad de este estudio fue baja (0,09), y de acuerdo con los valores descritos por Navarro *et al.* (2009a) (0,05 a 0,13), a partir de alevines para adultos. Una vez más, en lotes cultivados en una sola localidad mostraron heredabilidades superior, conforme Lee-Montero (2012) y García-Celdrán *et al.* (2015a), que describieron valores moderados (0,20 y 0,18, respectivamente). Todos estos resultados fueron inferiores a los resultados obtenidos por otros autores en otras especies, como en *Sciaenops ocellatus* por Saillant *et al.* (2007) (0,28), en la carpa común por Vandeputte *et al.* (2004) (0,37), y en la lubina por Dupont-Nivet *et al.* (2008) (0,19). La tendencia general en dorada es que para la CF las heredabilidades son más bajas en comparación con otras especies, lo cual podría estar relacionado con la alometría positiva hacia la altura (Ginés, 1997).

En cuanto a los caracteres de la carcasa, las estimaciones de heredabilidad descritas en diferentes especies oscilaron en un amplio rango. Para el peso de la canal en %, los valores oscilaron entre 0,02 (Powell *et al.*, 2008) y 0,45 (Kause *et al.*, 2002). En dorada, Navarro *et al.* (2009a) obtuvieron valores medios (0,31), mientras que Lee Montero (2012) y García-Celdrán *et al.* (2015a) estimaron valores bajos (0,06 y 0,07, respectivamente), como en este estudio (0,04). Esta gran diferencia entre las estimaciones de Navarro *et al.* (2009a) y otros autores, entre ellos el presente estudio, se puede explicar porque los lotes de Lee Montero (2012), García-Celdrán *et al.* (2015a) y este trabajo proceden de la misma

## RESUMEN ESPAÑOL

---

población de peces, perteneciente al programa PROGENSA. Para el peso de filete, los resultados también muestran una gran variación debida, posiblemente, a que hay una gran variabilidad en cuanto a los métodos de medida. En dorada, Navarro *et al.* (2009a), García-Celdrán *et al.* (2015a) y Lee Montero (2012) describieron valores inferiores y superiores (0,15, 0,17 y 0,41, respectivamente). En este estudio, se calcularon los valores medios para el peso de los filetes (0,35) describiendo así una base genética robusta y de alto potencial para la explotación de un mercado de fileteado (Luna, 2006).

En dorada, Janssen *et al.*, (2016) indicaron que los caracteres de calidad son los terceros en importancia en los procesos de selección genética. Esto es debido a que la industria y los consumidores prestan gran atención a la calidad de la carne ya que los productos de la acuicultura siempre se comparan con los de la pesca silvestre. Los valores de heredabilidad medios del contenido de lípidos y humedad obtenidos por este estudio están de acuerdo con las estimaciones descritas por Lee-Montero (2012) (0,17 y 0,20, respectivamente) y García-Celdrán *et al.* (2015a) (0,31 y 0,24, respectivamente). Navarro *et al.* (2009b) informaron de valores más bajos (0,05 y 0,09, respectivamente). Los valores más altos en este estudio, similares a los de Lee-Montero (2012) y García-Celdrán *et al.* (2015a), son probablemente debido a los métodos empleados y los antecedentes genéticos. Por lo tanto, Navarro *et al.* (2009b) determinó estos parámetros por métodos químicos y manuales, mientras que los de los otros estudios se determinaron mediante la metodología de NIR. Por otra parte, las poblaciones de peces utilizados por Lee-Montero (2012), García-Celdrán *et al.* (2015a), y este estudio pertenecen a diferentes muestras pertenecientes a programa de mejora PROGENSA. En cuanto al porcentaje de proteínas, la heredabilidad de este estudio fue baja (0,08), que coincide con las estimas de Lee-Montero (2012) (0,06), y García-Celdrán *et al.* (2015b) (0,03). Todo ello refleja la dificultad que presenta este carácter para ser mejorado por métodos directos.

En dorada, caracteres morfológicos están relacionados con el crecimiento, la canal, la carne y la calidad del pez (Lee-Montero, 2012). Ellos son relevantes ya que esta especie se comercializa principalmente como pescado entero, y la percepción visual de los alimentos en los alimentos generales y acuáticos, en particular, es extremadamente importante para el consumidor (Gumus *et al.*, 2011). Las técnicas de procesamiento de imágenes se han utilizado cada vez más para la evaluación de la calidad de los alimentos en los últimos años

(Su y Sun, 2004). El análisis de imágenes reduce las fuentes de variación entre las mediciones, si es correcta la metodología estandarizada, y aumenta la precisión de las estimaciones de los parámetros genéticos (Blonk *et al.*, 2010). En el presente estudio, diez de las 27 variables determinadas por el programa de análisis de imagen desarrollado por Navarro *et al.* (2016), y previamente no estudiados, fueron seleccionados con el fin de conocer su variación genética aditiva y las relaciones con los caracteres biológicos esenciales, que son seleccionados en las poblaciones de los programas de selección genética en la industria (Chavanne *et al.*, 2016; Janssen *et al.*, 2016). La heredabilidad de diez caracteres tecnológicos no invasivos (TLL, CPH, FilML, TaEL, SL, FHA, FHB, FHC, FHD, FHE) fueron estudiados en dos lotes de peces a escala industrial, provenientes de diferentes sistemas de cultivo (jaula y estero). Todos los caracteres tecnológicos no invasivos, conectadas con diferentes alturas de dorada (FHA, FHB, FHC, FHD, FHE), revelaron valores de heredabilidad entre moderado (0,17 para FHA) y alto (0,40 para FHC), a excepción de FHE que fue baja (0,09). Estos resultados sugieren que es posible cambiar la forma de dorada, a través de la selección, de acuerdo con los intereses comerciales de las empresas, para cumplir con las demandas del mercado. En cuanto a los caracteres relacionado con la longitud, y utilizando mediciones no invasivas por IMAFISH (TLL, FilML, TAEL y SL), los valores fueron similares a los obtenidos por la metodología manual (24,3 y 27,0 cm para la longitud en jaula y el estero, respectivamente, que se estima de forma manual, en comparación con 22,0 y 25,1 cm de longitud estándar en jaula y estero, respectivamente, medida por IMAFISH), por lo que la heredabilidad fue mejorada, como promedio en un 24% por el programa IMAFISH.

### *Dentro de grupo de caracteres*

Las correlaciones genéticas entre los caracteres de crecimiento fueron principalmente medias y altas. Entre caracteres de la carcasa fueron medias, y entre caracteres de la composición corporal: para la humedad frente al contenido de lípidos fue negativa y alta, para el contenido en proteínas frente a la humedad y lípidos fueron negativos y bajas. La correlación genética entre los caracteres tecnológicos no invasivos fueron altos.

Las correlaciones fenotípicas entre los caracteres de crecimiento fueron de bajas-medias a excepción de peso frente a la longitud, que fue alta. Entre caracteres de la carcasa fueron bajos, mientras que entre caracteres de la composición corporal: para la humedad frente al contenido de lípidos fue negativa y alta, para el contenido en proteínas frente a la

## RESUMEN ESPAÑOL

---

humedad y lípidos fueron negativas y bajas. Las correlaciones entre los caracteres fenotípicos tecnológicos fueron principalmente medias-altas, con excepción de CPH frente a FHA o FHB, FilML frente a FHB o FHC, FHD frente a FHA o FHB. Para FHA frente FHE fueron bajas, y para FHB frente a FHE fue negativa y baja.

### *Entre grupos de caracteres*

Las correlaciones genéticas entre caracteres de crecimiento y de la carcasa, las estimaciones fueron de medias y altas, a excepción de para longitud versus porcentaje de la canal, que fue baja. Entre los caracteres de crecimiento y de la composición corporal fueron generalmente de bajas-medias, a excepción de las características de crecimiento con la humedad, que fueron medias y negativas. Entre los caracteres tecnológicos no invasivos y los de crecimiento, fueron altas con el peso del filete y bajas con el porcentaje del peso canal. Entre los caracteres tecnológicos no invasivos y la composición corporal, fueron principalmente medias con el contenido en proteínas o lípidos, y medias y negativas con la humedad.

Las correlaciones fenotípicas entre los caracteres de crecimiento con los de la carcasa, fueron medias-altas en el caso de filete de peso, y bajas y negativas para porcentaje del peso canal. Entre los caracteres de crecimiento y de la composición corporal, en general fueron bajas, excepto con la humedad, que fueron medias y negativas. En cuanto a las correlaciones genéticas entre los caracteres de crecimiento y los tecnológicos, todas las estimaciones fueron medias-altas. Entre los caracteres de la carcasa y los tecnológicos, fueron altas para el peso de filete y bajas para el porcentaje de la canal. Para los caracteres tecnológicos y de la composición corporal, fueron principalmente bajas y positivas con el contenido en proteínas y lípidos, y bajas y negativas con la humedad.

Las correlaciones genéticas entre los caracteres de crecimiento (peso, longitud, CF, SGR) obtenidos en este estudio fueron altas y positivas, como se esperaba, y en concordancia con lo descrito previamente (Navarro *et al.*, 2009a; Fernandes *et al.*, 2010; Lee-Montero *et al.*, 2015; García-Celdrán *et al.*, 2015a). Sólo las correlaciones genéticas entre longitud y CF tienen una tendencia a ser menor, como también describieron Navarro *et al.* (2009a), Lee-Montero *et al.* (2015) y García-Celdrán *et al.* (2015a), probablemente debido a que el CF es un carácter derivado donde la longitud sufre una transformación cúbica. Los caracteres de crecimiento estuvieron correlacionados genéticamente con todos los caracteres tecnológicos no invasivos estudiados (desde 0,60 para la FHA-SGR a 1,00

para el peso-TLL, peso-TaEL, peso-SL, longitud-TLL, longitud-FilML, longitud-TaEL y la longitud-SL). Los altos valores de heredabilidad y correlaciones genéticas de los caracteres tecnológicos no invasivos, entre ellos y con a los caracteres de crecimiento, sugieren que la selección indirecta de estos últimos a través de los caracteres tecnológicos no invasivos es posible, al mismo tiempo que permitiría la evaluación de un mayor número de candidatos con el mínimo coste. Lo que a su vez aumentaría la ganancia genética y reduciría la tasa de endogamia (Sonesson *et al.*, 2012).

En cuanto a las correlaciones genéticas entre los caracteres de la carcasa y de crecimiento; el peso filete y peso / talla mostraron valores fueron altos y positivos, como ya se observó en dorada y otras especies (Gjerde y Gjedrem, 1984; Kause *et al.*, 2002, Neira *et al.*, 2004, Doupe y Lymbery, 2005; Rutten *et al.*, 2005;. Kause *et al.*, 2007; Kocour *et al.*, 2007; Powell *et al.*, 2008; Navarro *et al.*, 2009a;. Lee-Montero, 2012; García-Celdrán *et al.*, 2015a). Las correlaciones entre los porcentajes del peso canal y peso / longitud fueron medios (0,26 hasta 0,67), de acuerdo con estudios anteriores (Doupe y Lymbery, 2005; Rutten *et al.*, 2005; Kocour *et al.*, 2007). Por lo tanto, la selección directa para el peso o longitud, que son menos invasivos que el peso filete (con mayor heredabilidad que el peso y la longitud), debería aumentar, en algún sentido, la eficiencia alimenticia. Curiosamente, otros trabajos en la dorada encontraron estimaciones de correlación genética bajas o negativas entre la carcasa y el crecimiento (Navarro *et al.*, 2009a; Lee-Montero, 2012; García-Celdrán *et al.*, 2015a). Esta discrepancia entre los estudios puede ser debido al tamaño de los peces a la cosecha, ya que los peces producen proporcionalmente más hueso que carne con la edad en algunas poblaciones, debido a la alta correlación genética negativa existente entre el peso eviscerado y el peso filete en % (Navarro *et al.*, 2009a), o proporcionalmente más carne, como se indica mediante la correlación genética alta y positiva entre el peso eviscerado y peso filete en % (Lee-Montero, 2012). Estos resultados ponen de relieve la necesidad de corroborar los valores y sus signos mediante el análisis de poblaciones de peces en tamaños mayores, como el kilo (otra talla de comercialización de la especie), y discriminar entre carne y hueso a lo largo del desarrollo. En este estudio, caracteres de la carcasa denotaron valores altos y positivos o bajos y positivos para las correlaciones genéticas entre el peso canal en % o el peso filete frente a los caracteres tecnológicos no invasivos, respectivamente. Teniendo en cuenta que FHC mostró el valor más alto de heredabilidad (14% más que el peso de filete y 10 veces mayor que el peso canal en %), y las dos caracteres de la carcasa se correlacionaron positivamente, la selección

## RESUMEN ESPAÑOL

---

directa no invasiva para FHC generaría una respuesta a la selección indirecta similar sobre el filete peso que la selección directa sobre este último carácter (0,4% mayor indirecto sobre la selección directa). Sin embargo, la selección indirecta del peso canal en % a través del peso filete produciría una respuesta a la selección un 41% más alta que la selección directa para el peso canal en %. Por lo tanto, la selección directa de FHC, en forma no invasiva, produciría respuesta a la selección similar para el peso filete a la vez que una respuesta para el peso canal en %, a través de la correlación genética de este último con el peso filete, ya que directamente sería escasa debido a su muy baja heredabilidad (0,04).

Respeto a las correlaciones genéticas de los caracteres de calidad, los valores entre los contenidos en lípidos y humedad fueron altos y negativos, coincidiendo con los descritos tanto en dorada como en otras especies (Iwamoto *et al.*, 1990; Kause *et al.*, 2002; Quinton *et al.*, 2007; Navarro *et al.*, 2009b; Lee-Montero, 2012). Lee-Montero (2012) encontraron una correlación alta y negativa (-0.96) entre el contenido de proteína y el contenido de lípidos, sin embargo, en este estudio fueron negativos, pero bajos y con un alto error estándar ( $-0.03 \pm 0.23$ ). Por lo tanto, este resultado debe ser consolidado con otros estudios y poblaciones. Sin embargo, las correlaciones genéticas positivas entre los caracteres de calidad con los de crecimiento de este estudio, están de acuerdo con los resultados obtenidos por Lee-Montero (2012). Además, en este estudio, los rasgos tecnológicos no invasivos revelaron unas correlaciones genéticas altas y negativas con la humedad, medias y positivas con el contenido de lípidos y bajas y positivas con el contenido de proteína. Estas correlaciones genéticas y los valores estimados de heredabilidad, permitirían una respuesta a la selección indirecta mayor para los caracteres de calidad a través de la selección directa de los caracteres tecnológicos no invasivos, que tienen una heredabilidad alta, como el FHC, esperando así una respuesta a la selección no invasiva de los caracteres de calidad.

El uso de análisis de imágenes es un objetivo para la medición de las características morfológicas del pez. En los animales terrestres, donde está bien asentada la mejora genética, los estudios revelan que los caracteres morfológicos están genéticamente correlacionados con los rasgos de producción (Simm, 1998; Conafe, 2012). Por otro lado, la selección de las características de crecimiento puede alterar la forma de los peces a través de respuestas de selección indirectas (Blonk *et al.*, 2010), y también puede ser acompañada de un aumento en la prevalencia de malformaciones del cuerpo de los animales (Gjerdrem, 2005), y también en el pez en función de sus correlaciones genéticas. Gjerde *et al.* (1986,

2005) informaron deformaciones vertebrales en el salmón del Atlántico (0-0,36), con una correlación genética entre la deformidad y peso del pez, -0,22 a -0,42, lo que indica que un alto potencial de crecimiento genético no provoca deformidad. Kolstad *et al.* (2006) describieron deformidades de la columna (cifosis, lordosis, escoliosis) en el bacalao del Atlántico, 0,27, y sus correlaciones genéticas entre el peso y la aparición de deformidades de la columna, 0,50, lo que indica que el crecimiento rápido debe ser reconocido como un factor de riesgo para la incidencia de la deformidad. Kettunen y Fjalestad (2007), en el bacalao del Atlántico, indicaron una curvatura en la columna vertebral y las deformidades de la aleta pélvica, con rangos de heredabilidad de 0,33 a 0,42 y de 0,23 a 0,28, respectivamente. Por lo que estos autores recomendaron incluir estos rasgos en el índice de selección genético. Ando *et al.* (2008) describieron deformidades en una serie de vértebras abdominales, con heredabilidad de 0,65, y vértebras caudales, con heredabilidad de 0,84, en Masu salmón. La correlación genética entre ambos rasgos se estimó en -0,92. Kocour *et al.* (2006) describieron una deformidad de la aleta anal con baja heredabilidad de 0,07, en la carpa común. La correlación genética con otras deformidades esqueléticas (la boca y la aleta caudal) fueron altos, 0,78 a 0,88. Bardon *et al.* (2009), en la lubina, estimaron heredabilidades de 0,33 y 0,12 para la lordosis y la escoliosis, respectivamente. Se detectó una correlación genética positiva entre el peso y estas malformaciones, desde 0,21 a 0,40, donde deformidades tienen un impacto negativo en el crecimiento fenotípico. Kause *et al.* (2005) indicaron de una baja heredabilidad, 0,02, para la deformidad esquelética (cabeza, cuello, dorso o la cola), en la trucha arco iris. Detectaron correlación genética positiva entre el peso y la deformación, 0,18, lo que indica que cuando se aplica la selección para el crecimiento rápido se espera un incremento en la frecuencia de trastornos del desarrollo. Resultados similares han sido descritos en dorada por Astorga *et al.* (2004), que describe malformaciones morfológicas (38 tipos, incluyendo deformidades esqueléticas) con una heredabilidad de 0,74-0,85, de presencia-ausencia de cualquier deformidad, sugiriendo así de la presencia de genes mayores que pueden estar jugando un papel importante en las anomalías. Thorland *et al.* (2007, 2015) informaron de la deformidad de la columna (incluyen varios) y deformidades de la mandíbula en esta especie, con 0,12 y 0,16 como de heredabilidad, respectivamente. Lo que sugiere que las malformaciones, como carácter, tienen que ser incluidas en los procesos de selección. Recientemente, se han realizado estudios más amplios en esta especie, en el marco del proyecto PROGNSA, por Lee-Montero *et al.* (2015) y García-Celdrán *et al.* (2015c). Estos autores describen una variación

genética aditiva relevante para la lordosis, opérculo y la cabeza, genéticamente correlacionadas de manera positiva con las características de crecimiento, lo que sugiere la importancia de incluir su prevalencia en los índices de selección debido a la depreciación sufrida por los peces deformados, tanto en los criaderos como en las empresas de engorde, durante los procesos de comercialización. Por lo tanto, considerar y desarrollar nuevos caracteres tecnológicos no invasivos para la identificación de la deformidad, de un modo automático, parece muy importante para la industria, en términos de prevención de pérdidas económicas.

### 3.2.4 Interacción genotipo-ambiente

Las correlaciones genéticas para cada carácter a la talla de sacrificio, medidas en ambos sistemas de cultivo (jaula oceánica en las Islas Canarias y el estero en Andalucía), se muestran en la Tabla 3-4. Las correlaciones fueron medias-altas para todos los caracteres (entre 0,46 y 1,00), a excepción de FHA y FHB (0,05 y 0,16, respectivamente).

La dorada se produce mediante el uso de diferentes sistemas de producción con grandes diferencias ambientales entre ellos. Por lo tanto, es muy importante en los programas de engorde, estimar las interacciones GxE para evitar sus posibles efectos perjudiciales en el proceso de selección genética (Falconer y Mackay, 1996). Las interacciones pueden implicar cambios en orden de importancia para los genotipos entre los diferentes ambientes, y los cambios en la magnitud absoluta y relativa de las varianzas genéticas, ambientales y fenotípicas entre los ambientes (Bowman, 1972). En la cría de peces, la interacción GxE probablemente no es significativa cuando la correlación genética de un carácter medido en diferentes entornos es mayor que 0,7 (SAE-Lim *et al.*, 2013). En dorada, Navarro *et al.* (2009a), indicaron que las correlaciones genéticas entre las dos instalaciones que utilizaron para su estudio, tanques y jaulas oceánicas en la misma región, fueron altas; 0,8 para las características de crecimiento, y 0,93 para características de la canal. Navarro *et al.* (2009b), para las mismas instalaciones, describieron correlaciones genéticas de  $0,81 \pm 0,22$  para la grasa visceral,  $0,15 \pm 0,94$  para la grasa muscular,  $0,22 \pm 0,98$  para la humedad,  $0,27 \pm 0,66$  para la ceniza, y  $0,51 \pm 0,35$ , para el colágeno. Estos resultados indicaron interacción genotipo-ambiente baja o ausente para el crecimiento y características de la canal, incluida la grasa visceral. Mientras que la interacción genotipo-ambiente no puede ser descartada para caracteres de calidad, que también presentaron los mayores errores típicos. Lee-Montero *et al.* (2015) describieron, también en dorada, unas altas

correlaciones genéticas para detectar la presencia-ausencia de cualquier deformidad entre cinco instalaciones (0.65-0.99), incluidos los esteros y las jaulas oceánicas, indicando que las interacciones GxE no fueron relevantes. Estos autores también indicaron los valores de correlación genética que oscilaron entre 0,63 hasta 0,94 para la longitud, y de 0,05 a 0,99 para SGR. Estos resultados concuerdan con los resultados de este estudio, donde las correlaciones genéticas media-alta entre jaula oceánica y estero, para todos los caracteres se estimaron entre 0.46-1.00, a excepción de FHA y FHB, que fueron bajos (0,05 y 0,16, respectivamente), donde las interacciones GxE no pueden ser descartadas.

### 4 conclusiones

1- Los valores de los caracteres de crecimiento (peso, longitud forcal, factor de condición y el SGR o tasa de crecimiento específica), para los modelos de contribución de puesta masal a pequeña y gran escala estudiados en el presente trabajo (1DS, 4DL), presentaron valores medios y correlaciones fenotípicas acordes a la edad a la que los peces fueron sacrificados.

2- Los caracteres de crecimiento (peso, longitud forcal, factor de condición y el SGR), dentro del modelo de contribución de puesta masal 4DL de cuatro desoves consecutivos, mostraron valores mayores en los peces cultivados en tanques (PCTM, IFAPA), frente a sus hermanos coetáneos cultivados en jaulas oceánicas (ADSA) o esteros (PIMSA).

3- El modelo de contribución de puesta masal 4DL, perteneciente a la segunda generación del programa de mejora genética PROGENSA para el criterio “peso al sacrificio”, mostró valores medios de SGR un 18% superiores al modelo 2DL, perteneciente a la primera generación del programa.

4- La reacción de PCR múltiple de 11 marcadores microsatélites denominada SMsa1, mostró su alta eficiencia en la reconstrucción de la matriz de parentesco, entre los reproductores y descendientes del modelo de contribución de puesta masal 4DL, de cuatro desoves consecutivos, a pesar de poseer un 8% más de familias que un modelo de dos desoves masales consecutivos (2DL), y un 23% más de familias que un modelo de sólo un desove masal (1DL).

5- El modelo de contribución de puesta masal 4DL de cuatro desoves consecutivos, perteneciente a la segunda generación del programa de mejora genética PROGENSA, permitió mantener unos valores de censo efectivo de población por encima de 100 (155), y por lo tanto de control del crecimiento de la tasa de endogamia por generación por debajo del 1% (0,32%).

6- El modelo de contribución de puesta masal 4DL de cuatro desoves consecutivos, permite un alto número de reproductores que contribuyen a la descendencia, y un alto número de familias (hermanos completos y de medios hermanos maternos y paternos), maximizando la estructura familiar factorial.

7- Las estimaciones de heredabilidad para los caracteres de crecimiento, carcasa, composición corporal y nuevos caracteres tecnológicos no invasivos, de la segunda generación del programa de mejora genética PROGENSA, estuvieron comprendidas entre valores bajos y medios.

8- Las correlaciones genéticas dentro de cada grupo de caracteres fueron: para los caracteres de crecimiento, principalmente medias y altas. Para los caracteres de la carcasa, medias. Para los caracteres de composición corporal fueron: negativas y altas para la humedad frente al contenido de lípidos, mientras que para el contenido en proteínas frente a la humedad y/o lípidos fueron negativas y bajas. Para los nuevos caracteres tecnológicos no invasivos, las correlaciones genéticas entre los fueron altas.

9- Las correlaciones genéticas entre grupos de caracteres fueron: medias y altas entre los de crecimiento y carcasa, a excepción de longitud con porcentaje de la canal, que fue baja. Entre los caracteres de crecimiento y de la composición corporal fueron generalmente bajas-medias, a excepción de los caracteres de crecimiento con la humedad, que fueron medias y negativas. Entre los caracteres tecnológicos no invasivos y los de crecimiento, fueron altas con el peso del filete, y bajas con el porcentaje del peso canal. Entre los caracteres tecnológicos no invasivos y la composición corporal, fueron principalmente medias con el contenido en proteínas o lípidos, y medias y negativas con la humedad.

10- La selección directa sobre el carácter tecnológico no invasivo FHC (que mostró el valor de heredabilidad más alto de este estudio), produciría una respuesta indirecta a la selección para el peso filete, similar al de la selección directa sobre éste, lo que mejoraría a su vez la respuesta del porcentaje del peso canal (que mostró el valor de heredabilidad más bajo de este estudio), por la correlación genética media entre estas dos últimas.

11- Las correlaciones genéticas para cada carácter a la talla de sacrificio, medidas en ambos sistemas de cultivo, jaula oceánica y el estero, fueron medias-altas y positivas para todos los caracteres, a excepción de FHA y FHB que fueron bajas y positivas.

12- La conjunción del modelo de contribución de puesta masal 4DL de cuatro desoves consecutivos, con la introducción de nuevos criterios de selección a través de caracteres tecnológicos no invasivos, en el programa de mejora genética

## **RESUMEN ESPAÑOL**

---

PROGENSA, permitiría aumentar: el número de reproductores a evaluar a un menor coste, la capacidad reproductiva de los candidatos de alto valor genético, el control óptimo de la tasa de endogamia y la ganancia genética por generación y año.