

TÍTULO DEL PLAN

CONVOCATORIA 2016

INFORME FINAL. CIENTÍFICO-TÉCNICO-ECONÓMICO

FECHA: 30/03/2019

ÍNDICE DE CONTENIDOS

1. DATOS ADMINISTRATIVOS.....	3
1.1. Título del proyecto	3
1.2. Entidades participantes.....	3
1.3. Coordinador técnico del proyecto	3
1.4. Periodo de ejecución.....	3
1.5. Ayuda concedida	3
2. DATOS ECONÓMICOS	3
3. MODIFICACIONES DEL PROYECTO	4
3.1. Modificación de las actividades	4
3.2. Cambios en el equipo de trabajo	4
3.3. Cambios en el presupuesto	5
3.4. Cambios en el cronograma de trabajo	9
4. SEGUIMIENTO TÉCNICO	11
4.1. Objetivos	11
4.2. Actividades	12
ACTIVIDAD-A.1.....	12
ACTIVIDAD-A.2.....	35
ACTIVIDAD-A.3.....	50
ACTIVIDAD-A.4.....	70
ACTIVIDAD-A.5.....	79
4.3. Adecuación al cronograma de trabajo	83
4.4. Seguimiento de indicadores de ejecución y evaluación del proyecto	83
4.5. Transferencia de resultados al sector	85
4.6. Actuaciones de difusión y publicidad de las ayudas	86
4.7. Valoración del coordinador sobre la ejecución del proyecto	89
4.8. Conclusiones.....	90
ACTIVIDAD A.1	90
ACTIVIDAD A.2	90
ACTIVIDAD A.3	91
ACTIVIDAD A.4	91
ACTIVIDAD A.5	91

4.9. Referencias..... 92

1. DATOS ADMINISTRATIVOS

1.1. Título del proyecto

MEJORA DE LA COMPETITIVIDAD DEL SECTOR DE LA DORADA A TRAVÉS DE LA SELECCIÓN GENÉTICA (PROGENSA-III)

1.2. Entidades participantes

- AGENCIA ESTATAL CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS (CSIC)
- INSTITUTO ESPAÑOL DE OCEANOGRAFÍA (IEO)
- EL INSTITUTO ANDALUZ DE INVESTIGACIÓN Y FORMACIÓN AGRARIA, PESQUERA, ALIMENTARIA Y DE LA PRODUCCIÓN ECOLÓGICA (IFAPA)
- UNIVERSIDAD DE LAS PALMAS DE GRAN CANARIA (ULPGC)
- UNIVERSIDAD POLITÉCNICA DE CARTAGENA (UPCT)

1.3. Coordinador técnico del proyecto

JUAN MANUEL AFONSO LÓPEZ

1.4. Periodo de ejecución

DICIEMBRE DE 2016 – OCTUBRE DE 2018

1.5. Ayuda concedida

Indicar el importe de la ayuda concedida por resolución.

577.109,87€ SEGÚN RESOLUCIÓN DE 5 DE DICIEMBRE DE 2016

2. DATOS ECONÓMICOS

Indicar el presupuesto concedido en la resolución:

	2016	2017	2018 ¹	2019 ¹
Presupuesto concedido	288.554,89 €	144.277,49 €	0 €	144.277,49 €
Presupuesto ejecutado	288.554,89 €	144.277,49 €	0 €	129.965,44 € ²

¹ En concordancia con la prórroga concedida al proyecto PROGENSA-III por el DIRECTOR GENERAL DE ORDENACIÓN PESQUERA Y ACUICULTURA, D. Juan Ignacio Gandarias Serrano, el 19 de noviembre de 2018, solicitada previamente por el coordinador de PROGENSA-III el 26 de julio de 2018.

² Según el investigador Principal del IFAPA (Dr. Manuel Manchado), 8.869,05€ no los pudieron consumir. Según la Investigadora Principal del IEO (Dra. Marta Arizcum), 5.442,998€ no los pudieron consumir. Por lo que PROGENSA-III ha consumido del total del proyecto el 97,52%. Estando este importe en el último año, donde sólo ha consumido el 90,08% del importe de esa anualidad (144.277,49€)

3. MODIFICACIONES DEL PROYECTO³

3.1. Modificación de las actividades

Indicar, en su caso, los cambios producidos en las actividades contempladas en la memoria científico-técnica y la justificación de estas modificaciones.

PROGENSA-III no ha sufrido modificación alguna en sus actividades a desarrollar, tal y como estas fueron planteadas en el proyecto y que son:

ACTIVIDAD-A.1

- O1. Producción de una tercera generación de animales seleccionados
- O2. Optimización de la gestión y manejo de reproductores de élite bajo puesta masal,
- O3. Generar un banco de tejido

ACTIVIDAD-A.2

- O4. Explorar el efecto de dietas altamente eficientes

ACTIVIDAD-A.3

- O5. Estudiar la variabilidad genética para la resistencia a patógenos

ACTIVIDAD-A.4

- O6. Desarrollar nuevas Tecnologías Facilitadoras Clave (KET's)

ACTIVIDAD-A.5

- O7. Jornadas de transferencia de conocimiento

3.2. Cambios en el equipo de trabajo

Indicar cualquier modificación en la composición y dedicación del equipo de trabajo.

PROGENSA-III no ha sufrido modificación alguna en la composición de su equipo de trabajo. Así, se mantienen las cinco instituciones participantes desde el inicio, cada una dentro del marco de las actividades encomendadas a cada una de ellas, y que son:

- IATS CSIC
- IEO
- IFAPA
- ULPGC
- UPCT

³ Las modificaciones técnicas o económicas del proyecto deberán haber sido aprobadas por el órgano instructor (punto 4 del apartado decimocuarto de la orden de convocatoria).

3.3. Cambios en el presupuesto

Indicar, en su caso, los cambios respecto a los gastos contemplados en el presupuesto incluido en la memoria científico-técnica del proyecto y la justificación de éstos.

Los cambios de presupuesto se indican desglosados por periodo oficial en los que ha habido que presentar informes; 2016-2017, 2018-2019

Periodo 2016-2017

- IATS CSIC

El CSIC solicitó el 20 de julio de 2017 el cambio de 9.500 € de material fungible a material inventariable para la adquisición de un FISHREADER (para el registro y toma de datos; 5.500€), un refractómetro (para la trazabilidad del medio salino; 1.000€) y un electrodo de iones amonio (para la trazabilidad de la calidad del agua mediante test colorimétricos; 3.000€). Todo lo cual fue aprobado por EL DIRECTOR GENERAL DE RECURSO PESQUEROS Y ACUICULTURA, D. José Miguel Corvinos Lafuente, el 4 de agosto de 2017.

- IEO

El IEO solicitó pasar a 2018: a) todos los gastos de personal, b) 2.000 € de material inventariable, c) 3.580 € de viajes y dietas, todo lo cual se corresponde con un montante final de 12.251,25 €, lo que representa un valor final inferior al 13%.

- IFAPA

Debido a la ejecución financiera del subproyecto de Andalucía, y ante la necesidad de poder ajustar los presupuestos a la situación de desarrollo de los trabajos de investigación y las demoras administrativas en su ejecución, se solicitó redistribuir algunas partidas económicas tal como se describe a continuación:

- 1) Cambiar la partida de personal de 8.778,60 € del año 1 a la partida de fungible de año 1. Este cambio se debió a la imposibilidad de contratar personal este año. La convocatoria se retrasó y no se pudo ejecutar el presupuesto asignado.
- 2) Cambiar la partida de fungible de 5.023,74 € del año 2 a la partida de fungible de año 1. Este cambio se solicitó para agilizar la compra de productos de laboratorio para análisis en el primer año.
- 3) Cambiar la partida de Estabulación de 500 € del año 2 a la partida de Estabulación de año 1. Este cambio se solicitó para agilizar la alimentación de los peces en el primer año
- 4.) Cambiar de la partida de Consumible 837,50 € del año 2 a la partida de Consumible de año 1. Este cambio se realizó para agilizar los análisis de laboratorio en el primer año.
- 5) Cambiar 1.000 € de la partida de Viajes y Dietas de año 1 a subcontratación de año 2. Este se debió a que no se pudo ejecutar el presupuesto total del primer año y fue necesario incrementar la partida de subcontratación.
- 6) Cambiar 10.500 € de la partida de subcontratación de año 1 a subcontratación de año 2. Se firmó un contrato con APROMAR tras su aprobación por MAPAMA, y otro con la Universidad de Málaga que está en proceso de firma tras la supervisión del letrado. Este año sólo se podrá realizar una ejecución parcial de estas partidas y se deben trasladar a 2018.

Todo lo cual fue aprobado por LA DIRECTORA GENERAL DE RECURSO PESQUEROS Y ACUICULTURA, Dña. Isabel Artime García, el 6 de octubre de 2017.

- ULPGC

No solicitó cambio alguno.

- UPCT

La UPCT solicitó traspasar 11.434,15 € de Personal y 639,81 € de Viajes y Dietas a Material Fungible, dejando este último concepto en un montante final de 33.895,46 €. Todo lo cual fue aprobado por EL DIRECTOR GENERAL DE RECURSO PESQUEROS Y ACUICULTURA, D. José Miguel Corvinos Lafuente.

Periodo 2018-2019

- IEO

El IEO solicitó el 17 de julio de 2018, una modificación presupuestaria consistente en pasar el importe correspondiente a los 4 meses de *contrato* que se quedarán sin cubrir (7.911,92 €) desde el concepto de *personal* a otros conceptos. Se disminuiría así la partida de *viajes y dieta* pasando de 3.580 € que estaba presupuestado a 1.500 €. De esta manera, la partida de *fungible*, que no tenía presupuesto asignado, quedaría con un importe de 5.617,66 € y aumentaría la partida de *material inventariable*. Así, el presupuesto de la 2ª anualidad quedaría de la siguiente manera

CONCEPTO	AÑO 2
Personal (8 meses de contrato)	15.823,84
Material inventariable	2.500,00
Material fungible	5.617,66
Viajes y dietas	1.500,00
Costes indirectos	5.088,30
TOTAL ELEGIBLE	30.529,85

Ante la demanda de JACUMAR de aclarar cómo quedaría el cuadro presupuestario, sin descontar la cantidad de más justificada en la 1ª anualidad, posteriormente matizado por el IEO matiza el 24 de septiembre de 2018, donde en el caso de que no haya que restar al presupuesto de la anualidad 2ª la cantidad de más que se justificó en la anualidad 1ª, el presupuesto de la 2ª anualidad con las modificaciones quedaría de la siguiente manera:

- Del importe de *personal* correspondiente a los 4 meses de contrato que se quedaban sin cubrir (7.911,92 €) se añadirían 500 € a *material inventariable* y el resto (7.411,92 €) se pasarían a *material fungible*.

CONCEPTO	AÑO 2
Personal (8 meses de contrato)	15.823,84
Material inventariable	2.500,00
Material fungible	7.411,92
Viajes y dietas	3.580,00
Costes indirectos	5.863,15
TOTAL ELEGIBLE	35.178,91

De esta manera, la cantidad total de la 2ª anualidad no variaría respecto a la cantidad presupuestada inicialmente, pero la suma de esta cantidad con el total justificado en la 1ª anualidad excedería del total presupuestado para el proyecto.

Todo lo cual fue aprobado por la SECRETARÍA DE LA JUNTA NACIONAL ASESORA DE CULTIVOS MARINOS (JACUMAR), el 28 de septiembre de 2018 (email a las 12:14).

- IFAPA

El IFAPA, solicita una modificación presupuestaria el 7 de junio de 2018, para completar los análisis de PROGENSA III y poder realizar la selección de los animales reproductores de la siguiente generación, es necesario un esfuerzo adicional en los análisis de genotipado. Dado el retraso en la selección de personal, la partida prevista en personal no se podrá ejecutar y por ello solicitamos un cambio de partida al concepto de fungibles. Este cambio de presupuesto teniendo en consideración el ya aprobado en octubre de 2017 supone el 19.95% del total aprobado a IFAPA. Abajo se indica el presupuesto aprobado y los cambios solicitados.

Modificación Octubre2017					
TOTAL/CCAA:	IFAPA -2				
CONCEPTO	AÑO 1	AÑO 2	TOTAL	%	SUMA
Personal	0,00 €	20.483,40 €	20.483,40 €	-6,57	111.378,55
Material Inventariable	3.000,00 €	0,00 €	3.000,00 €		
Material fungible	53.752,34 €	0,00 €	53.752,34 €	6,57	
Estabulación	4.789,27 €	0,00 €	4.789,27 €		
Consumible	1.453,54 €	0,00 €	1.453,54 €		
Viajes y dietas	3.000,00 €	0,00 €	3.000,00 €	-0,75	
Otros gastos	8.400,00 €	0,00 €	8.400,00 €		
SUBCONTRATACIÓN	5.000,00 €	11.500,00 €	16.500,00 €	0,75	
Costes indirectos	15.879,03 €	6.396,68 €	22.275,71 €		22.275,71
TOTAL ELEGIBLE:	95.274,18 €	38.380,08 €	133.654,26 €		133.654,26
COSTE TOTAL:				-7,32	
%	71.3%	28.7%			

Modificación Mayo 2018						
TOTAL/CCAA:	IFAPA -2					
CONCEPTO	AÑO 1	AÑO 2	TOTAL	%	SUMA	
Personal	0,00 €	3.600,00 €	3.600,00 €	-19,20	111.378,55	
Material Inventariable	3.000,00 €	0,00 €	3.000,00 €			
Material fungible	53.752,34 €	16.883,40 €	70.635,74 €	19,20		
Estabulación	4.789,27 €	0,00 €	4.789,27 €			
Consumible	1.453,54 €	0,00 €	1.453,54 €			
Viajes y dietas	3.000,00 €	0,00 €	3.000,00 €	-0,75		
Otros gastos	8.400,00 €	0,00 €	8.400,00 €			
SUBCONTRATACIÓN	5.000,00 €	11.500,00 €	16.500,00 €	0,75		
Costes indirectos	15.879,03 €	6.396,68 €	22.275,71 €			22.275,71
TOTAL ELEGIBLE:	95.274,18 €	38.380,08 €	133.654,26 €			133.654,26
COSTE TOTAL:			%	19,95		
%	71,3%	28,7%				

Todo lo cual fue aprobado por la SECRETARÍA DE LA JUNTA NACIONAL ASESORA DE CULTIVOS MARINOS (JACUMAR), el 29 de junio de 2018 (email a las 11:43).

El IFAPA, solicita una nueva modificación presupuestaria el 30 de julio sobre la previamente solicitada el 7 de junio de 2018. Desde la última solicitud de presupuesto se ha incurrido en un gasto de dietas y locomoción necesario para el análisis de muestras y seguimiento de actividades. Por ello es necesario, realizar una distribución entre anualidades y un pequeño cambio en la partida de fungible respecto al presupuesto aprobado y que respecto al presupuesto original supone el 19.81% del total aprobado a IFAPA. Abajo se indica el presupuesto aprobado en 2016 y los cambios solicitados.

Modificación Mayo 2018						
TOTAL/CCAA:	IFAPA -3					
CONCEPTO	AÑO 1	AÑO 2	TOTAL	%	SUMA	
Personal	0,00 €	3.600,00 €	3.600,00 €	-19,20	111.378,55	
Material Inventariable	3.000,00 €	0,00 €	3.000,00 €			
Material fungible	53.752,34 €	16.883,40 €	70.635,74 €	19,20		
Estabulación	4.789,27 €	0,00 €	4.789,27 €			
Consumible	1.453,54 €	0,00 €	1.453,54 €			
Viajes y dietas	3.000,00 €	0,00 €	3.000,00 €	-0,75		
Otros gastos	8.400,00 €	0,00 €	8.400,00 €			
SUBCONTRATACIÓN	5.000,00 €	11.500,00 €	16.500,00 €	0,75		
Costes indirectos	15.879,03 €	6.396,68 €	22.275,71 €			22.275,71
TOTAL ELEGIBLE:	95.274,18 €	38.380,08 €	133.654,26 €			133.654,26
COSTE TOTAL:			%	19,95		
%	71,3%	28,7%				

Modificación Julio 2018						
TOTAL/CCAA:	IFAPA-4					
CONCEPTO	AÑO 1	AÑO 2	TOTAL	%	SUMA	
Personal	0,00 €	3.600,00 €	3.600,00 €	-19,20	111.378,55	
Material Inventariable	3.000,00 €	0,00 €	3.000,00 €			
Material fungible	53.752,34 €	16.704,40 €	70.456,74 €	19,07		
Estabulación	4.789,27 €	0,00 €	4.789,27 €			
Consumible	1.453,54 €	0,00 €	1.453,54 €			
Viajes y dietas	1.947,00 €	1.232,00 €	3.179,00 €	-0,61		
Otros gastos	8.400,00 €	0,00 €	8.400,00 €			
SUBCONTRATACIÓN	5.000,00 €	11.500,00 €	16.500,00 €	0,75		
Costes indirectos	15.879,03 €	6.396,68 €	22.275,71 €			22.275,71
TOTAL ELEGIBLE:	94.221,18 €	39.433,08 €	133.654,26 €			133.654,26
COSTE TOTAL:			%	19,81		
%	70,5%	29,5%				

Todo lo cual fue aprobado por la SECRETARÍA DE LA JUNTA NACIONAL ASESORA DE CULTIVOS MARINOS (JACUMAR), el 9 de septiembre de 2018 (email a las 10:10).

3.4. Cambios en el cronograma de trabajo

Indicar, en su caso, las prórrogas del proyecto autorizadas por el órgano instructor y/o los cambios producidos en la distribución temporal de las actividades.

En el proyecto PROGENSA-III se estableció un cronograma que se indica en la siguiente figura 1, si bien finalmente se ha ejecutado el indicado en la figura 2. Como se puede apreciar, se han cumplido todas las tareas en plazo y forma, excepto que en algunas tareas que se relacionan a continuación, se ha tenido que adelantar el trabajo a tenor de la necesidad de sincronizar adecuadamente las justificaciones del proyecto con los ciclos biológicos y del sistema de producción de la dorada.

Tarea A.1-2. Control de Rendimientos: se mantiene dicha tarea para los meses 7, 8 y 9 del segundo año del proyecto para las muestras de engorde de la clase año 2017, llevadas a cabo por el IEO-UPCT e IFAPA. Mientras que para las muestras de la clase año 2016, llevadas a cabo por la ULPGC e IFAPA se han adelantado a los meses 10, 11 y 12 del primer año del proyecto, por lo que entran en la primera justificación de 30 de noviembre de 2017.

Tarea A.1-3. Análisis de paternidad: se mantiene dicha tarea para los meses 7, 8 y 9 del segundo año del proyecto, para las muestras de engorde de la clase año 2017, llevadas a cabo por el IEO-UPCT e IFAPA. Mientras que para las muestras de la clase año 2016, llevadas a cabo por la ULPGC e IFAPA se han adelantado a los meses 6, 7, 8, 9, 10, 11 y 12 del primer año del proyecto, por lo que entran en la primera justificación de 30 de noviembre de 2017. Ello está motivado por el adelanto de parte de la Tarea A.1-2, ya que van en paralelo.

Tarea A.1-6. Banco de Muestras: se mantiene dicha tarea para los meses 7, 8 y 9 del segundo año del proyecto, para las muestras de engorde de la clase año 2017, llevadas a cabo por el IEO-UPCT e IFAPA. Mientras que para las muestras de la clase año 2016, llevadas a cabo por la ULPGC e IFAPA se han adelantado a los meses 11 y 12 del primer año del proyecto, por lo que entran en la primera justificación de 30 de noviembre de 2017. Ello está motivado por el adelanto de parte de la Tarea A.1-2, ya que van en paralelo.

Tarea A.2-2. Análisis de Paternidad: la tarea planificada en el primer año para los meses 5, 6 y 7, se ha llevado a cabo entre los meses 10, 11 y 12, acorde a cómo ha transcurrido en crecimiento de los alevines de la clase año 2017, proporcionada por el IFAPA y pre-engordada por el IEO, antes de ser remitida al CSIC (IATS). Esto ha hecho que las muestras hayan llegado más tarde a la ULPGC, desde donde se lleva a cabo al análisis de paternidad en colaboración con el IFAPA, pero en cualquier caso, siempre dentro de primer año, tal y como estaba planificado.

Tarea A.5-1. Jornadas de Transferencia: la tarea planificada en el primer año para el mes 12, se llevó a cabo en el mes 5, después de varias reuniones vía Skype con REMA, D. Juan Manuel Fernández Aldana, pues el sector consideró mejor hacer difusión inicial de PROGENSA-III, para de algún modo introducir los “inputs” de las empresas, al margen de que posteriormente se lleven a cabo nuevas acciones de transferencia. En cuanto a la [Jornada de Transferencia al sector industrial](#) programada para el mes 12 del segundo año, se trasladó al mes 9 del segundo año después de las coordinaciones llevadas a cabo entre el IFAPA y REMA.

En el cuadro no se considera modificación alguna en la distribución de las actividades acorde a la concesión de la prórroga, a tenor de que ésta fue concedida para la elaboración del INFORME DE SEGUIMIENTO FINAL, así como la presentación de la JUSTIFICACIÓN ECONÓMICA.

		PRIMERA ANUALIDAD [Año1]												SEGUNDA ANUALIDAD [Año2]											
		M1*	M2	M3	M4	M5	M6	M7	M8	M9	M10	M11	M12	M1	M2	M3	M4	M5	M6	M7	M8	M9	M10	M11	M12
	ACTIVIDAD-A.1																								
CRÍA Y CULTIVO	Tarea A.1-1.																								
CONTROL DE RENDIMIENTO	Tarea A.1-2.																								
ANÁLISIS DE PATERNIDAD	Tarea A.1-3.																								
ESTIMACIÓN DE PARÁMETROS GENE	Tarea A.1-4.																								
OPTIMIZACIÓN DE LA CONTRIBUCIÓN	Tarea A.1-5.																								
BANCO DE MUESTRAS	Tarea A.1-6.																								
	ACTIVIDAD-A.2																								
INTERACCIÓN NUTRICIÓN-GENOMA	Tarea A.2-1.																								
ANÁLISIS DE PATERNIDAD	Tarea A.2-2.																								
	ACTIVIDAD-A.3																								
INFECCIONES EXP. VIBRIO - PHOTOB.	Tarea A.3-1.																								
INFECCIONES CON LYMPHOCYSTIS	Tarea A.3-2.																								
INFECCIONES EXP. ENTEROMYXUM	Tarea A.3-3.																								
ANÁLISIS DE LA RESPUESTA INMUNIT	Tarea A.3-4.																								
ANÁLISIS DE PATERNIDAD	Tarea A.3-5.																								
	ACTIVIDAD-A.4																								
BASE DE DATOS	Tarea A.4-1.																								
	ACTIVIDAD-A.5																								
JORNADAS DE TRANSFERENCIA	Tarea A.5-1.																								

Figura 1. Cronograma planificado en la memoria del proyecto

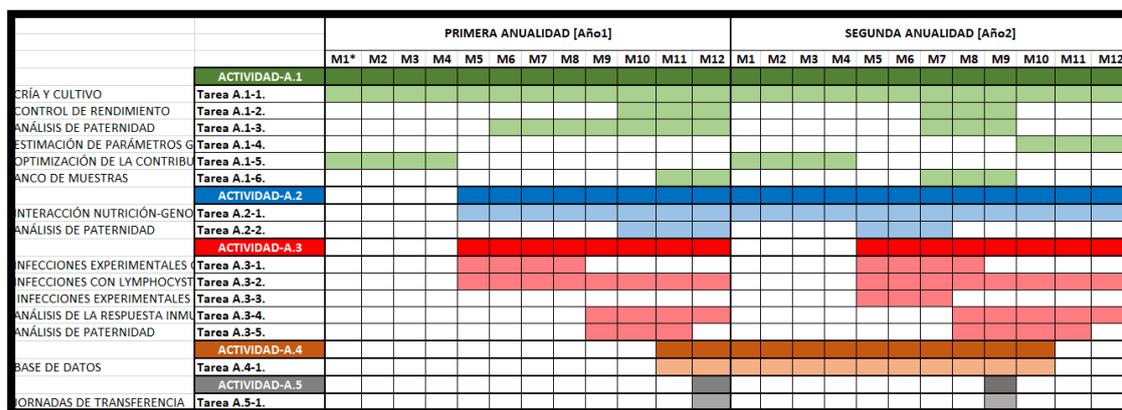


Figura 2. Cronograma ejecutado del proyecto

4. SEGUIMIENTO TÉCNICO

4.1. Objetivos

Indicar el grado de consecución, hasta la fecha, de cada uno de los objetivos (generales y específicos) contemplados en la memoria científico técnica presentada, mediante la siguiente tabla resumen:

OBJETIVOS	% CONSECUCIÓN OBJETIVOS
Objetivo-1. Producción de una tercera generación de animales seleccionados	100%
Objetivo-2. Optimización de la gestión y manejo de reproductores de élite bajo puesta masal	100%
Objetivo-3. Generar un banco de tejido	100%
Objetivo-4. Explorar el efecto de dietas altamente eficientes	100%
Objetivo-5. Estudiar la variabilidad genética para la resistencia a patógeno	100%
Objetivo-6. Desarrollar nuevas Tecnologías Facilitadoras Clave (KET's)	100%
Objetivo-7. Jornadas de transferencia de conocimiento	100%
TOTAL	100%

4.2. Actividades

Indicar la ejecución de cada una de las actividades contempladas en el proyecto a través de la siguiente tabla resumen:

ACTIVIDADES	ESTADO DE EJECUCIÓN		% EJECUCIÓN
	FINALIZADA	NO REALIZADA	
Actividad A.1-1. Cría y Cultivo	x		100%
Actividad A.1-2. Control de Rendimiento	x		100%
Actividad A.1-3. Análisis de Paternidad	x		100%
Actividad A.1-4. Estimación de parámetros	x		100%
Actividad A.1-5. Optimización contribución	x		100%
Actividad A.1-6. Banco de muestras	x		100%
Actividad A.2-1. Interacción Nutrición-Genoma	x		100%
Actividad A.2-2. Análisis de paternidad	x		100%
Actividad A.3-1. Infecciones bacterias	x		100%
Actividad A.3-2. Infecciones virus	x		100%
Actividad A.3-3. Infecciones parásitos	x		100%
Actividad A.3-4. Análisis de la respuesta	x		100%
Actividad A.3-5. Análisis de paternidad	x		100%
Actividad A.4-1. Base de datos	x		100%
Actividad A.5-1. Jornadas de Transferencia	x		100%
TOTAL			100%

Incluir, para cada una de las actividades la siguiente información:

- Entidades participantes
- Presupuesto inicial y Presupuesto ejecutado
- Descripción de las tareas y trabajos realizados
- Subcontrataciones
- Resultados obtenidos
- Incidencias

ACTIVIDAD-A.1

O1. Producción de una tercera generación de animales seleccionados (élite) para crecimiento y morfología basada en poblaciones de animales bajo explotación industrial, el marco de PROGENSA®, a través de la producción de descendientes evaluados para caracteres de crecimiento, rendimiento, calidad del pez y de la carne, en todas las condiciones de cultivo de dorada de España (esteros y jaulas) y diferentes localizaciones (Atlántica y Mediterránea), cuantificando la interacción Genotipo-Ambiente (Familia-Condiciones de producción).

Tarea A.1-1. CRÍA Y CULTIVO

Participantes: ULPGC – IFAPA - IEO

Para realizar la evaluación genética de una tercera generación de animales seleccionados de PROGENSA, se han llevado a cabo el establecimiento de lotes de reproductores a escala industrial en tres instalaciones:

- Lote de control (animales no seleccionados, 46 reproductores) y élite (animales seleccionados para crecimiento y baja prevalencia en deformidades, 53 reproductores) en las instalaciones del IFAPA.
- Lote de control (animales no seleccionados, 30 reproductores) y élite (animales seleccionados para crecimiento y baja prevalencia en deformidades; reproductores) en las instalaciones de la ULPGC.
- Lote de control (animales no seleccionados, 140 reproductores [90 ♂ y 50 ♀]) en las instalaciones del IEO.

Protocolos de cultivo

Se siguieron los protocolos de cultivo estándares para dorada, tal y como se describe en Roo et al. (1999) y Lee-Montero et al. (2015). Para lo cual se llevaron a cabo siembras a escala industrial, cada una de ellas compuesta de huevos recogidos en cuatro días consecutivos (4DL), con proporcionalidad de cada uno de los cuatro días en la composición final del lote a sembrar. Así, se sembraron tanto lotes de animales de élite como de control en las instalaciones de IFAPA y ULPGC, mientras que en el caso del IEO sólo se sembraron lotes control porque el stock de reproductores del IEO nunca antes había sido sometido a procesos de selección genética.

Todos los reproductores de las tres instituciones (IFAPA, IEO, ULPGC), están identificados con PIT-tags para disponer de una trazabilidad total de los lotes a producir, los cuales además han sido caracterizados con la Supermúltiplex de PCR de marcadores microsatélites SMsa1 (Lee-Montero et al., 2013), y que fueron:

- En el caso del IFAPA se han producido dos clases años (denominadas como CA16 y CA17) a partir de los reproductores F2 del programa PROGENSA para el proyecto PROGENSA-III, de tal forma que permitiese la evaluación final de caracteres de crecimiento, rendimiento, calidad del pez y de la carne al final del engorde, así como la comparación con otros stocks de producción (Mediterráneo-Atlántico) en el período de ejecución del proyecto.

En la CA16 se usó descendencia de una F2 de 53 parentales y una F2 sin seleccionar (Control) de 46 parentales en Andalucía. Estos animales se acondicionaron desde finales 2015 con fotoperíodo corto (8L:16D) a una temperatura que varió entre 19-20°C. El periodo de puesta fue entre enero y junio de 2016. Para el período de puesta, los animales se alimentaron con dieta especial de reproductores (Skretting Vitalis Cal). Las puestas se cosecharon diariamente y se monitorizaron las tasas de fecundación y la tasa de eclosión. Cuando dichas tasas eran óptimas (>80%), la siembra se sincronizó con la ULPGC la siembra de los tanques.

- En el caso de la ULPGC, el procedimiento fue similar al descrito anteriormente para las instalaciones del IFAPA, excepto que sólo se produjo la clase año 2016 (CA16) y que el número de reproductores fue diferente (30 animales para los élite y otros 30 animales para los control).

- En el caso del IEO, sólo se produjo la clase año 2017, CA17, con un stock de reproductores de dorada formado por 90 ♂ y 50 ♀, adaptados a las condiciones de cultivo, que producen puestas de forma natural entre 150 y 200 millones de huevos por estación reproductora. Todos los individuos están identificados con el sistema individual *Passive Integrated Transponder* y sus genotipos han sido analizados por la UPCT con la múltiplex SMsa1 (Lee-Montero et al., 2013). Previamente a la estación de puesta los reproductores fueron colocados en tanques con circuito cerrado a 19-20°C y alimentados con pienso especial de reproductores. Las puestas comenzaron

el 14.12.2016 y se sucedieron casi diariamente hasta el 05.06.2017 con unos porcentajes medios de fecundación del 80% y de eclosión del 94%.

Siembras

Participantes: IFAPA – ULPGC – AQUANARIA - PIMSA

Clase año 2016 (CA16)

Entre el 24.03 y 07.04 llegaron 4 lotes de larvas recién eclosionadas, 2 Control y 2 Élite. Se llevó a cabo el cultivo larvario de 120.000 larvas/lote en tanques cilíndricos de 1,5 m³ de capacidad siguiendo la misma metodología del apartado anterior. Se hicieron muestreos periódicos de crecimiento larvario y se enviaron muestras a ULPGC para el análisis genético.

Tabla 1. Características de las siembras de la CA16. Se indica fecha de las puestas, el número de larvas usado y los porcentajes relativos en los tanques de cultivo larvario.

	Siembra S1 IFAPA			Siembra S3 IFAPA			
	Fecha	Total Larvas	%	Fecha	Total Larvas	%	
Control	28/01/16	68,000	23.6	Control	29/02/16	36,000	35.6
	29/01/16	90,000	31.3		01/03/16	15,000	14.9
	30/01/16	90,000	31.3		03/03/16	25,000	24.8
	1/02/16	40,000	13.9		04/03/16	25,000	24.8
EliteF2Aa	28/01/16	68,000	22.8	EliteF2Aa	01/03/16	25,000	25.0
	29/01/16	90,000	30.2		02/03/16	25,000	25.0
	30/01/16	90,000	30.2		03/03/16	25,000	25.0
	1/02/16	50,000	16.8		05/03/16	25,000	25.0
EliteF2Ab	07/02/16	100,000	25.9				
	09/02/16	100,000	25.9				
	10/02/16	100,000	25.9				
	11/02/16	86,000	22.3				

El cultivo de las larvas se realizó de acuerdo con el protocolo estándar que se siguió en ciclos de selección previos (García-Celdrán, et al., 2015; García-Celdrán, et al., 2016a, b). En el caso de las dos primeras siembras de Control y EliteF2, un problema en la calidad del agua a los 31 días de vida (dph) hizo que el control muriera y el lote de EliteF2Aa redujera la cantidad de larvas. El lote EliteF2b siguió su cultivo de forma adecuada y a los 88 dph se desdobló para evitar el canibalismo (10.812 postlarvas de 0,96g y 16.811 de 0,30 g). A los 93 y 100 dph, las larvas se volvieron a dividir para evitar la dispersión excesiva de tallas tal como se muestra en la Figura. 3. Cuando los animales de la EliteF2a tenían 124 días de vida y los de la Elite F2b 113 días, se enviaron 2,242 peces a la ULPGC (11,6% de la EliteF2a y 88,4% de EliteF2b). De igual forma, la ULPGC envió 786 peces de la EliteF2 y 130 de Controles F2 de la ULPGC para crear los grupos de evaluación.

A día 140, se comenzaron los marcajes de los 2,263 animales y que incluyeron 1,247 peces de IFAPA (eliteF2a 8,2% y eliteF2b 91,8%) así como los peces procedentes de Canarias (eliteF2C y controlF2C). Los animales marcados se mantuvieron en IFAPA y los 23.476 peces restantes se transportaron a PIMSA, para su evaluación. Debido a un fallo de oxigenación, los peces de la empresa murieron en su mayoría y se estimó una supervivencia de 2.000 peces, por lo que hizo

un nuevo envío a la empresa PIMSA para incrementar el número de animales en evaluación. En las instalaciones del IFAPA Toruño se mantuvieron 1.400 peces marcados como plan de contingencia.

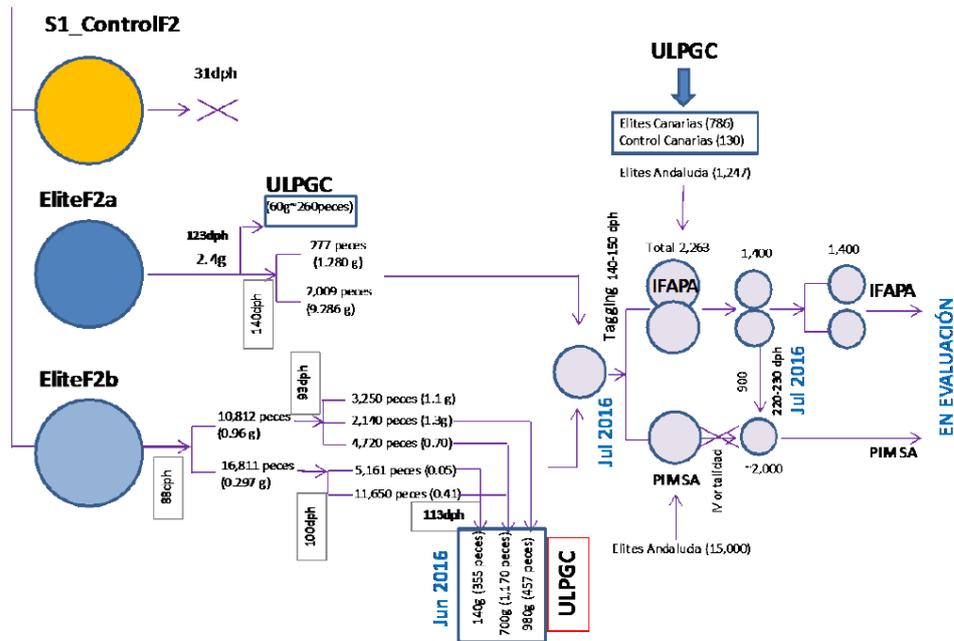


Figura 3. Esquema de la producción de familias de la *clase año CA16* para la siembra 1.

Además de la siembra S1, en IFAPA en coordinación con la ULPGC se realizó una siembra 3 (Tabla 1) con el objetivo de determinar con mayor precisión el progreso en la selección genética durante los dos ciclos de selección realizaos. Para ello, se establecieron dos grupos de doradas (controlF2A y EliteF2A) en tanques por duplicado. Al destete (40 días), 251 peces del grupo controlF2A con un peso de 0,19g se mezclaron con 1.058 peces del grupo EliteF2A. De este grupo S3, 307 peces de 0.45 g se enviaron a la ULPGC para su cría y el resto se mantiene en la instalación para su evaluación prevista para noviembre de 2017.

Los datos de peso de los muestreos al marcaje y los muestreos intermedios realizados a los 90 y 253 días tras el marcaje para al CA16 correspondiente a la S1 se muestran en la Figura 4. Los peces del grupo de controlF2C son los que tuvieron un mayor peso al marcaje. Sin embargo, a los 253 las elites EliteF2A y EliteF2C estaban recuperando estas diferencias iniciales e incluso en el caso de los peces en IFAPA, con un mayor peso medio. En octubre de 2017 a los 481 días tras el marcaje (620 dph) está previsto el sacrificio final.

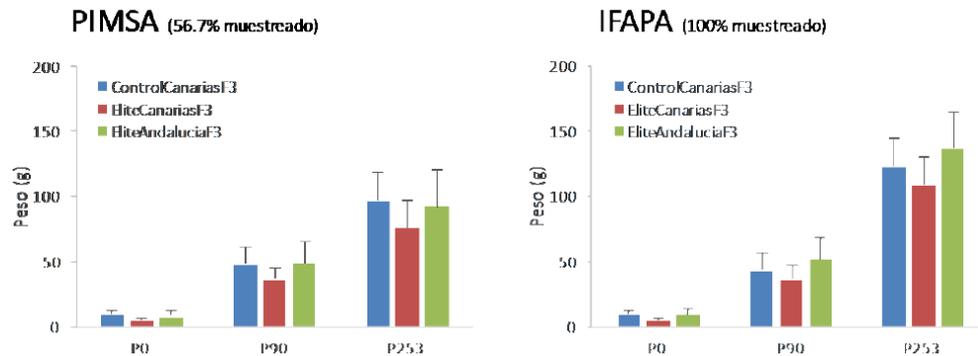


Figura 4. Pesos al marcaje, a los 90 y 253 en las instalaciones de PIMSA E IFAPA en la CA2016.

Participantes: IFAPA - IEO – UPCT – PIMSA – SERVICIOS ATUNEROS DEL MEDITERRÁNEO

Clase año 2017 (CA17)

Se realizó una nueva clase año, para lo cual se sembraron un tanque control y otro de eliteF2. La recogida de puestas de los reproductores IEO se sincronizó con ULPGC e IFAPA y se realizó en cuatro días consecutivos para aumentar el número de familias. A partir del 12.02.17 se seleccionaron las puestas de mejor calidad según los porcentajes de fecundación, simetría de las divisiones, gotas de grasa, y porcentajes de eclosión, y se trasladaron a tanques incubadores cilindro-cónicos de 1.000 litros de capacidad, provistos de circuito abierto de agua de mar y control de temperatura.

Se obtuvieron 1 millón de larvas que se cultivaron en un tanque cilíndrico de 5 m³ de capacidad, a una densidad inicial de 100 larvas/l, temperatura de 19°C, salinidad 38‰, y fotoperiodo 16:8 (L: D). Se utilizó el método del agua verde añadiendo los 20 primeros días 70 ml/m³/día de un concentrado comercial de fitoplancton con un 80% de *Nannochloropsis sp.* Durante esta etapa la renovación del agua fue del 2%/día. Posteriormente los tanques se pusieron en circuito abierto (30%/hora) con aireación ligera para mantener los valores de oxígeno disuelto alrededor de 6 mg/litro. La intensidad de la luz fue de 1.000 luxes en la superficie del agua y el fotoperiodo 16:8 (L: D). Las larvas fueron alimentadas con rotífero (10-20/ml) desde el 6 al 25 días post eclosión (dpe), nauplios de Artemia (1/ml) desde 17 al 27 dpe, metanauplios enriquecidos de Artemia (3-5ml) del 20 al 55 dpe, y pienso comercial del 40 dpe en adelante.

A los 22 dpe las larvas fueron muestreadas con el programa de análisis de imagen Leica *Application Suite V 4.3*, registrando la longitud total (LT), altura de la cabeza (HC), diámetro del ojo (DO), y porcentaje de formación de vejiga natatoria. Se llevaron a cabo muestreos periódicos de crecimiento larvario con el fin de confirmar el correcto crecimiento de los ejemplares.

Tabla 2. Características de las siembras de la CA17. Se indica fecha de las puestas, el número de larvas usado y los porcentajes relativos en los tanques de cultivo larvario

Siembra S1 IFAPA			
	Fecha	Total Larvas	%
ControlA	05/02/17	97.000	31.1
	07/02/17	85,000	27.2
	10/02/17	130,000	41.7
	12/02/17	100,000	24.4
EliteF2A	13/02/17	100,000	24.4
	19/02/17	100,000	24.4
	20/02/17	110,000	26.8

En el caso del grupo EliteF2A, al día 37 se desdobló en dos tanques (promedio 0,12 g/pez y 0,3 g/pez) (Fig4B). A los 92 días tras la eclosión de la población, un lote de aproximadamente 3.000 peces de EliteF2A y 300 de ControlA se intercambiaron con IEO de Murcia. El resto de peces se mantuvieron en la instalación hasta su marcaje. Dado el mayor número de larvas en el grupo EliteF2A se tuvo que desdoblar el tanque hasta 3 veces (lotes a, b, c). En total se produjeron 2.758 peces d control y 8.853 de EliteF2A. Como se puede observar en la figura 4 se muestra el crecimiento de los grupos ControlA y EliteF2A. La diferencia de crecimiento se acentúa tras el destete debido a la mayor carga de los lotes de EliteF2A.

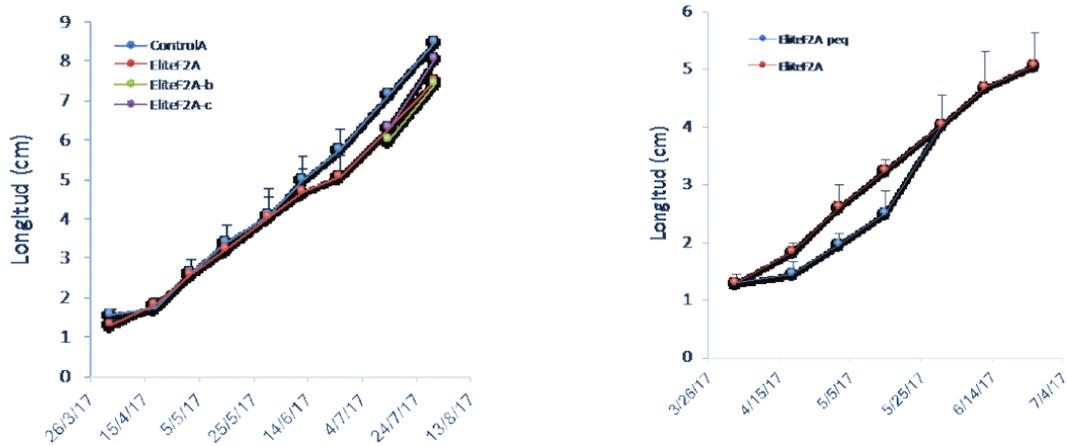


Figura 4. Izq: Longitud del controlA y EliteF2A en diferentes tanques desdoblados: Dcha: Longitud de lotes desdoblados de EliteF2A

El IEO envió a IFAPA 6.200 alevines para preengorde y transporte a jaulas y esteros (crecimiento) y retos bacterianos y víricos contemplado en la Actividad 3, a la vez que recibieron 5.000 alevines el 19.05.

Los días 13 y 14 de septiembre de 2017 se marcan con PIT en la cavidad abdominal 2.100 alevines de IEO de 7 g y 2.100 alevines de IFAPA/CANARIAS de 10 g. Los días 9 y 10 de octubre, utilizando el FishReader de TROVAN, se hace el muestreo individual de todos los peces destinados al crecimiento en jaulas mediterráneas –marca, peso y talla- y se toma una muestra de aleta para

el análisis genético que se realizará al final de la etapa de engorde. Quedan en tanques separados los peces marcados y muestreados destinados a la fase de engorde en la empresa Servicios Atuneros del Mediterráneo S.L. (Murcia), 1.100 alevines de IFAPA/CANARIAS de reproductores de ELITE (seleccionados) y CONTROL (no seleccionados) y 1.000 de IEO que son trasladados a la jaula mediterránea en el mes de noviembre, a las instalaciones de la empresa Servicios Atuneros del Mediterráneo S.L. (San Pedro del Pinatar, Murcia).

Tabla 3. Datos fenotípicos (talla y peso) de los alevines de los dos orígenes diferentes (IFAPA + ULPGC e IEO Murcia)

	Peso 230dpe (gramos)		Talla230dpe	
	AND-CAN	MUR	AND-CAN	MUR
Media	9,83	8,97	14,06	11,45
Mediana	9,75	8,86	12,97	10,79
Varianza	1,39	0,72	31,89	12,55
Desviación estándar	1,18	0,85	5,65	3,55
Error estándar	0,035	0,029	0,167	0,124
Mínimo	7,04	7,20	3,00	4,99
Máximo	14,03	13,42	54,66	35,53
Asimetría	0,353	1,316	1,230	2,062
Curtosis	-0,144	3,661	3,193	7,721

Un grupo de 3.000 peces queda en las instalaciones del IEO, para la realización de infecciones experimentales con patógenos bacterianos. Una muestra representativa de alevines de diferente origen queda reservada en las instalaciones del centro como medida de seguridad para salvaguardar los objetivos del proyecto PROGENSA-III.

El 10.10.2017, los alevines presentes en el IEO fueron muestreados. Así, Los alevines procedentes del IFAPA y ULPGC fueron de mayor peso ($13,7 \pm 0,18$ vs. $11,5 \pm 0,12$ gramos) y talla ($97,8 \pm 0,38$ vs. $89,7 \pm 0,30$ mm) que los del IEO Murcia (Figura 5 y 6, tabla 4).

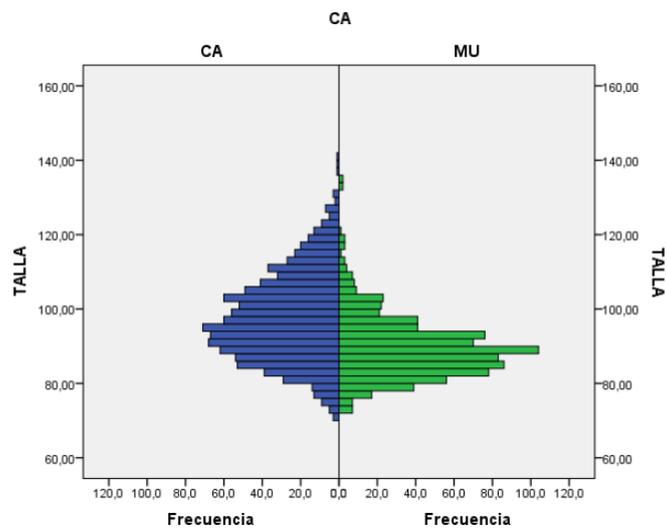


Figura 5. Histograma de la distribución de la talla de los alevines de los dos orígenes diferentes (CA=IFAPA + ULPGC, y MU = IEO Murcia) el día 10-10-2017

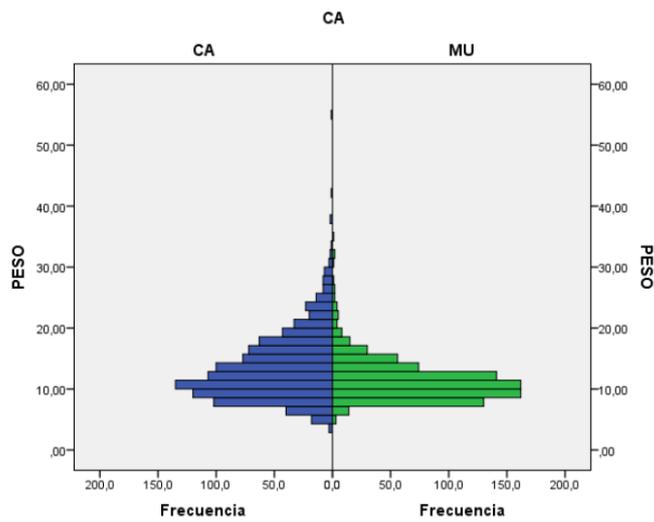


Figura 6. Histograma de la distribución de la talla de los alevines de los dos orígenes diferentes (CA=IFAPA + ULPGC, y MU = IEO Murcia) el día 10-10-2017

Tabla 4. Datos fenotípicos (talla y peso) de los alevines de los dos orígenes diferentes (IFAPA + ULPGC e IEO Murcia)

TALLA (mm)			Estadístico	S.E.
IFAPA-ULPGC N = 1002	Media		97,77	0,38
	intervalo de confianza 95%	Límite inferior	97,03	
		Límite superior	98,50	
	Mediana		96,53	
	Varianza		141,30	
	Desviación estándar		11,89	
	Mínimo		70,42	
	Máximo		140,27	
	Rango		69,85	
	Rango intercuartil		16,30	
	Asimetría		,419	0,077
	Curtosis		-,075	0,154
IEO MU N = 817	Media		89,72	0,30
	intervalo de confianza 95%	Límite inferior	89,13	
		Límite superior	90,30	
	Mediana		88,64	
	Varianza		71,98	
	Desviación estándar		8,48	
	Mínimo		72,00	
	Máximo		134,20	
	Rango		62,20	
	Rango intercuartil		9,65	
	Asimetría		1,316	0,086
	Curtosis		3,661	0,171
PESO (g)				
IFAPA-ULPGC N = 1002	Media		13,66	0,18
	intervalo de confianza 95%	Límite inferior	13,31	
		Límite superior	14,01	
	Mediana		12,40	
	Varianza		31,08	
	Desviación estándar		5,58	
	Mínimo		3,00	
	Máximo		54,66	
	Rango		51,66	
	Rango intercuartil		6,91	
	Asimetría		1,377	0,077
	Curtosis		4,029	0,154
IEO MU N = 817	Media		11,45	0,12
	intervalo de confianza 95%	Límite inferior	11,21	
		Límite superior	11,70	
	Mediana		10,79	
	Varianza		12,55	
	Desviación estándar		3,54	
	Mínimo		4,99	
	Máximo		35,53	
	Rango		30,54	
	Rango intercuartil		3,67	
	Asimetría		2,062	0,086
	Curtosis		7,721	0,171

Los alevines del IEO que son trasladados a las instalaciones de la empresa Servicios Atuneros del Mediterraneo S.L. (San Pedro del Pinatar, Murcia) (Figura 7), son criados en una jaula en el Mar Mediterráneo bajo condiciones intensivas de crianza: jaula de 11 metros de diámetro anclada a 38 metros de profundidad (temperatura promedio del agua $18,2 \pm 0,9^{\circ}\text{C}$, oxígeno disuelto: 7,4 mg/l, salinidad: 37,9‰; datos estimados en condiciones de mar abierto) y alimentados con un pienso comercial (39% de proteína, 21% grasa, 2% de fibra; Dibaq S.A., Fuentepeelayo-Segovia).

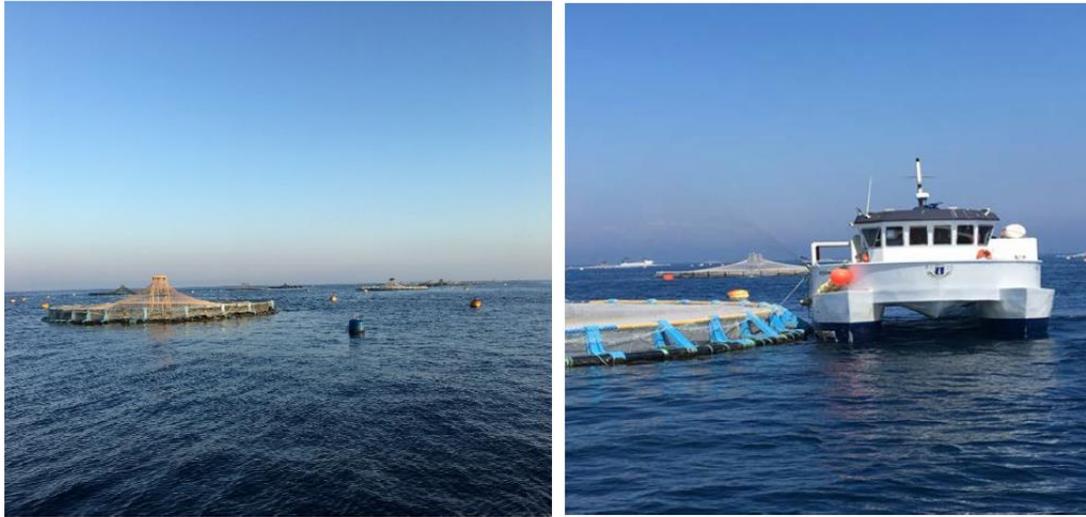


Figura 7. Servicios Atuneros del Mediterraneo S.L. (San Pedro del Pinatar, Murcia, España)

Para la CA17, en septiembre, a la edad 206 dph se realizó el marcaje intraperitoneal con chips electrónicos. En la Tabla 5 se muestran el número de animales de ControlA, EliteF2 y Murcia marcados y enviados a las instalaciones de la empresa PIMSA y los mantenidos en IFAPA centro El Toruño. El peso medio fue $19,3 \pm 9,1$ g y $20,4 \pm 9,8$ g, respectivamente. La siembra de animales se realizó el 2 de octubre de 2017.

Tabla 5. Número de animales por origen. Se indica el peso medio.

<i>Origen</i>	PIMSA		Toruño	
	<i>n</i>	<i>Peso</i>	<i>n</i>	<i>Peso</i>
ControlA	140	$30,1 \pm 9,1$	143	$31,1 \pm 10,7$
EliteF2A	1.019	$20,3 \pm 8,6$	697	$20,7 \pm 9,0$
Murcia	426	$13,2 \pm 5,2$	279	$14,1 \pm 5,1$
	1.585	$19,3 \pm 9,1$	1,119	$20,4 \pm 9,8$

Tarea A.1-2. CONTROL DE RENDIMIENTO

Participantes: IFAPA – ULPGC – AQUANARIA - PIMSA

Clase año 2016 (CA16)

Para todos los animales sacrificados en PIMSA y los peces vivos en la instalación del Toruño se le tomó aleta y se extrajo ADN para la asignación de parentesco. Posteriormente los animales se genotiparon con la SMsa1 (Lee-Montero et al., 2013) en colaboración con la ULPGC poniendo en común todos los animales de la clase 2016 para las estimas genéticas. Para las estimas se consideró prioritario el análisis de crecimiento (peso y longitud) y malformación. La media poblacional fue de 471 ± 97 g para el peso y de $25,3 \pm 1,9$ cm para la longitud. En el caso, de IFAPA se evaluaron un total de 913 reproductores vivos para la construcción de una nueva generación mejorada. Para ello, se realizaron varias simulaciones para mantener un adecuado control de consanguinidad al mismo tiempo que favorecía el progreso por generación (Tabla 6). Así, se ha conseguido diseñar 5 lotes que se podrán compartir con las empresas con una maximización del progreso de hasta el 20% con un nivel aceptable de consanguinidad (0.06), mientras que para el

núcleo de selección se mantendrán niveles de progreso <10% pero con consanguinidad <0.05. Además, se identificaron dos lotes de bajo crecimiento para ensayos comparativos en el plan de selección.

Tabla 6. Características de las simulaciones realizadas en función del parentesco, consanguinidad (ΔF), valor mejorante (VGA) y el progreso por generación (%)

Lote	Nº peces	Parentesco medio (F)	ΔF	VGA medio	Mejora por generación (%)
IFAPA 1	60	0,0361	-0,0067	24,76	5,2
IFAPA 2	60	0,0444	0,0021	57,44	12,1
IFAPA 3	60	0,0413	-0,0011	43,99	9,3
IFAPA Super (4)	60	0,0592	0,0168	92,88	19,6
IFAPA PRO 20% (5)	60	0,0572	0,0149	96,32	20,3
IFAPA 10% (6)	60	0,0595	0,0171	49,56	10,4
Bajo-Crecimiento1	41	0,0477	0,00534	-43,24	-9,1
Bajo-Crecimiento2	43	0,0497	0,00734	-45,82	-9,7

Los resultados descriptivos de la clase CA16 se muestran en las tablas 7, 8 y 9. En la tabla 7 están las estimaciones de los caracteres de crecimiento y calidad de la carne en la población completa. La descomposición de los caracteres de crecimiento y calidad de la carne por origen y sistema de cultivo son descritos en las tablas 8 y 9, respectivamente.

Tabla 7. Resultados descriptivos de los caracteres de crecimiento y calidad de la carne en la población completa.

	Parámetros	N	Rango	Mínimo	Máximo	Media	Desviación estándar	Coefficiente de variación (%)
TOTAL	Peso	2.493	779,6	108,40	888,00	466,20 \pm 2,39	118,74	25,47
	Longitud	2.492	24,8	15,20	40,00	26,12 \pm 0,06	2,99	11,48
	Factor de condición		0,05	0	0,04	0,03 \pm 0,00009	0,01	16,29
	Colágeno (%)	2.389	2,83	0,01	2,83	1,15 \pm 0,01	0,51	44,06
	Grasa (%)	2.465	13,19	1,84	15,03	6,69 \pm 0,04	2,20	32,90
	Humedad (%)		16,88	62,50	79,38	70,76 \pm 0,05	2,33	3,29
	Proteína (%)		6,93	16,98	23,91	21,11 \pm 0,02	0,99	4,67
	FFM (%)	1.370	18,70	2,00	20,70	12,46 \pm 0,07	2,46	19,77

En la población total (Tabla 7), la máxima variación fue mostrada por los caracteres de calidad de la carne (20,94% de coeficiente de variación), principalmente debido al contenido en colágeno del músculo. Secundariamente, el contenido en grasa del músculo mostró una alta variación (32,9%), la cual fue del 60% más que este mismo carácter cuando fue medido mediante

el FFM (19,77%), cuando ambos fueron no invasivos (caracteres NTT). En relación a los caracteres de crecimiento, el peso mostró el máximo nivel de variación (25,47%), y el nivel de variación mínimo lo mostró la longitud (11,48%).

Tabla 8. Resultados descriptivos de los caracteres de crecimiento y calidad de la carne, acorde al origen.

Origen	Parámetros	N	Rango	Mínimo	Máximo	Media	Desviación estándar	Coefficiente de variación (%)
Andalucía	Peso	1.122	740,5	108,4	848,9	412,37 ± 3,39	113,63	27,55
	Longitud		18,7	15,2	33,9	23,83 ± 0,07	2,50	10,48
	Factor de condición		0,04	0,01	0,05	0,03 ± 0,00008	0,003	8,56
	Colágeno (%)	1.099	2,82	0,01	2,83	1,33 ± 0,14	0,48	35,94
	Grasa (%)	1.104	13,19	1,84	15,03	6,67 ± 0,08	2,49	37,37
	Humedad (%)		12,93	62,5	75,43	69,61 ± 0,06	2,10	3,01
	Proteína (%)		6,18	17,73	23,91	21,08 ± 0,03	1,11	5,29
Islas Canarias	Peso	1.370	761,00	127,00	888,00	510,29 ± 2,80	103,76	20,33
	Longitud		21,40	18,60	40,00	27,99 ± 0,05	1,86	6,64
	Factor de condición		0,04	0	0,04	0,02 ± 0,0001	0,002	10,60
	Colágeno (%)	1.289	2,73	0,01	2,74	0,99 ± 0,13	0,8	48,39
	Grasa (%)	1.360	13,83	1,86	14,09	6,70 ± 0,05	1,93	28,81
	Humedad (%)		14,73	64,65	79,38	71,76 ± 0,06	2,04	2,85
	Proteína (%)		6,54	16,98	23,52	21,14 ± 0,02	0,87	4,11
	Peso	1.370	18,70	2,00	20,70	12,46 ± 0,07	2,46	19,77

Considerando la información por origen (Tabla 8), todos los caracteres (crecimiento y calidad de la carne) muestran valores más altos en las Islas Canarias (jaulas oceánicas) que en Andalucía (esteros y tanques), excepto para el factor de condición (30% más elevado en los esteros que en jaulas oceánicas). Siendo la longitud donde esta diferencia es máxima (57,75%). El promedio del coeficiente de variación por origen (incluyendo todos los caracteres), fue similar (18,13% y 17,69% para Andalucía e Islas Canarias, respectivamente). Es reseñable la variación del contenido en grasa del músculo, la cual fue un 30% más alta en las Islas Canarias que en Andalucía. Estos resultados fueron similares, donde los datos son mostrados por sistema de cultivo (Tabla 9). Para todos los caracteres, las jaulas oceánicas mostraron valores más altos que los esteros y los tanques, excepto en el factor de condición. Sin embargo, entre los Sistema de estero y tanque, los tanques mostraron un promedio más alto de la estima de la varianza para los caracteres de crecimiento y de calidad de la carne (2,5%).

Table 9. Resultados descriptivos de los caracteres de crecimiento y calidad de la carne, acorde al sistema de cultivo o compañía.

Compañía	Parámetros	N	Rango	Mínimo	Máximo	Media	Desviación estándar	Coefficiente de variación (%)
PIMSA	Peso	473	677,70	171,20	848,90	490,67 ± 4,64	100,92	20,57
	Longitud		14,90	19,00	33,90	25,57 ± 0,84	1,83	7,15
	Factor de condición		0,04	0,01	0,05	0,03 ± 0,0001	0,002	7,80
	Colágeno (%)	451	2,22	0,01	2,23	1,20 ± 0,02	0,44	36,45
	Grasa (%)	455	11,06	1,84	12,9	5,03 ± 0,08	1,66	32,94
	Humedad (%)		11,48	63,95	75,43	71,10 ± 0,06	1,36	1,92
	Proteína (%)		6,18	17,73	23,91	21,80 ± 0,37	0,79	3,65
IFAPA	Peso	650	480,70	108,40	589,1	355,30 ± 3,33	84,73	23,85
	Longitud		12,3	15,2	27,5	22,56 ± 0,08	2,13	9,42
	Factor de condición		0,02	0,03	0,04	0,03 ± 0,0001	0,003	8,46
	Colágeno (%)	649	2,74	0,09	2,83	1,42 ± 0,02	0,48	34,02
	Grasa (%)	650	12,45	2,58	15,03	7,83 ± 0,09	2,33	29,79
	Humedad (%)		11,38	62,5	73,88	68,57 ± 0,07	1,88	2,74
	Proteína (%)		5,99	17,81	23,8	20,58 ± 0,04	1,03	4,99
AQUANARIA	Peso	1,370	761,00	127,00	888,00	510,29 ± 2,80	103,76	20,33
	Longitud		21,40	18,60	40,00	27,99 ± 0,05	1,86	6,64
	Factor de condición		0,04	0	0,04	0,02 ± 0,0001	0,002	10,60
	Colágeno (%)	1,289	2,73	0,01	2,74	0,99 ± 0,13	0,48	48,39
	Grasa (%)	1,360	13,83	1,86	14,09	6,70 ± 0,05	1,93	28,81
	Humedad (%)		14,73	64,65	79,38	71,76 ± 0,06	2,04	2,85
	Proteína (%)		6,54	16,98	23,52	21,14 ± 0,02	0,87	4,11

	FFM (%)	1,370	18,70	2,00	20,70	12,46 ± 0,07	2,46	19,77
--	---------	-------	-------	------	-------	--------------	------	-------

Participantes: IFAPA – IEO – UPCT – SERVICIOS ATUNEROS DEL MEDITERRÁNEO - PIMSA

Clase año 2017 (CA17)

El día 24 de octubre de 2018 se procedió al sacrificio (619 días tras la eclosión) de una subpoblación de animales de la clase año 2017 criada en las instalaciones de la empresa PIMSA en esteros (Tabla 10). La evaluación se hizo completa y para cada animal se tomó un registro fotográfico y se tomó muestra para generar el banco de muestras del proyecto PROGNSA.

Tabla 10. Datos de los peces sacrificados en estero

Grupo	n	Peso inicial	longinicial	Pesofinal	tallafinal	P.eviscerado	SGR
Control	36	36.5±11.1	10.9±1.0	215.3±53.3	19.1±1.6	202.7±50.2	0.44±0.07
Elite2	186	21.4±8.1	9.3±1.1	239.0±65.3	19.7±2.0	223.9±60.6	0.60±0.08
Murcia	36	12.9±4.2	7.8±0.8	230.3±63.5	19.2±1.8	216.1±59.7	0.71±0.08

Simultáneamente, se muestrearon los vivos de la clase año 2017 en las instalaciones en el Toruño. Los datos se indican en la Tabla 11. Para todos los animales se tomó aleta para estudio genético e identificación de valores mejorantes.

Tabla 11. Datos de los peces vivos en las instalaciones El Toruño. Peso al marcaje (peso 1), a los 257 d (Peso 2) y 410 d tras el marcaje (Peso 3). Se indican las SGR en el primer (SGR1) y segundo período (SGR2)

	n	Peso1	Peso2	Peso3	SGR1	SGR2	SGR total
Control	138	31.3±10.4	115.6±42.0	253.1±101.0	0.50±0.10	0.45±0.17	0.49±0.10
Elite	636	21.4±8.9	129.7±48.7	309.3±87.3	0.70±0.10	0.53±0.15	0.65±0.08
Murcia	257	14.3±4.9	120.4±43.2	315.1±80.6	0.82±0.12	0.58±0.13	0.75±0.07

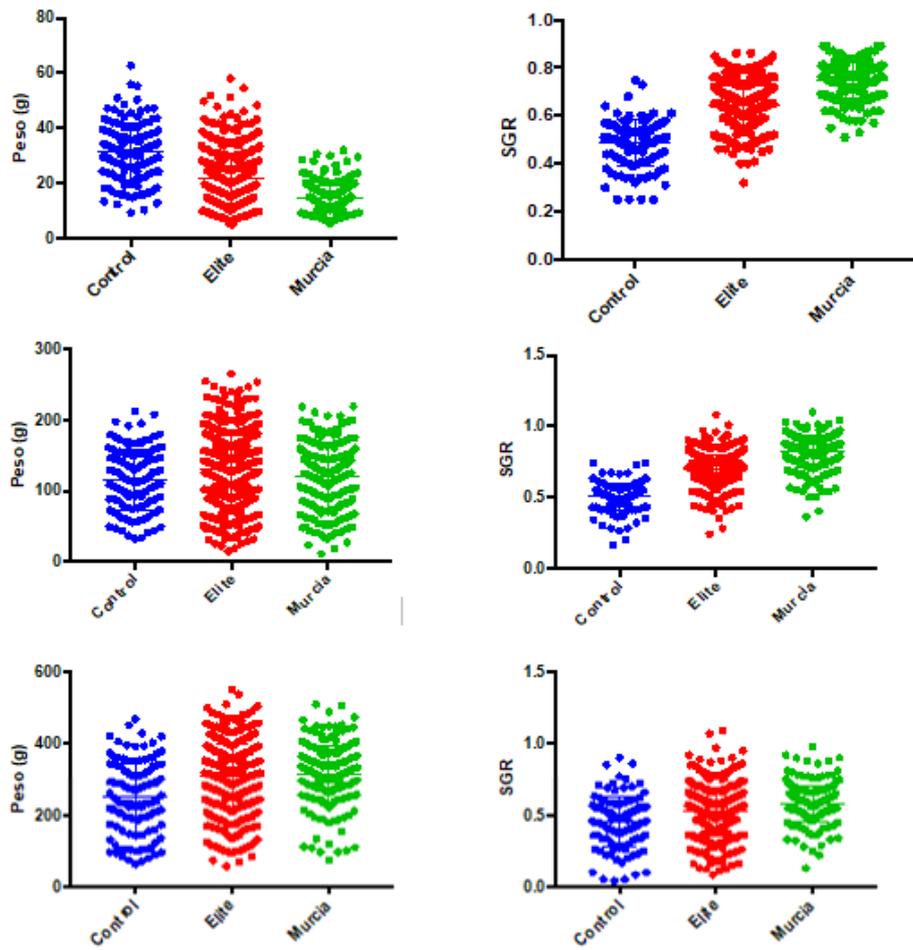


Figura. 8. Izq, Registro de peso en gramos al marcaje, a los 257 d y a lo 410 d de la clase año 2017. Dcha, Valores de SGR (izq) en % d-1 entre el marcaje y 247d(SGR1), entre 247 y 410 (SGR2) y en el periodo completo (marcaje-410)

El día 21 de noviembre de 2018, 600 días post-eclosión, se lleva a cabo el sacrificio de los peces que estaban en la jaula en condiciones mediterráneas, y se registra la siguiente información de estos peces:

- Peso
- Talla
- Presencia de malformaciones
- Fotografías para posterior análisis de malformaciones
- Rendimiento canal
- Rendimiento filete

El peso y la talla se muestran en la tabla 12, donde se puede observar que las doradas procedentes de Andalucía y Canarias tenían un mayor peso y talla que las de la Región de Murcia.

Tabla 12. Datos fenotípicos (talla y peso) de las doradas de los dos orígenes diferentes (IFAPA + ULPGC e IEO Murcia)

	Peso 600dpe (gramos)		Talla 600dpe (mm)	
	AND-CAN	MUR	AND-CAN	MUR
Media	243	211	247	229
Mediana	238	210	250	230
Desviación estándar	55,1	60,7	18,2	24,7
Error estándar	2,31	4,03	0,77	1,63
Mínimo	53,3	72	155	160
Máximo	543,2	371	300	285

Tabla 13. Correlaciones entre el peso y la talla a diferentes edades

		Correlaciones			
		Peso600dpe	Talla600dpe	Talla230dpe	Peso230dpe
Peso600dpe	Correlación de Pearson	1	,907**	,438**	,461**
	Sig. (bilateral)		,000	,000	,000
	N	794	794	794	791
Talla600dpe	Correlación de Pearson	,907**	1	,412**	,473**
	Sig. (bilateral)	,000		,000	,000
	N	794	794	794	791
Talla230dpe	Correlación de Pearson	,438**	,412**	1	,959**
	Sig. (bilateral)	,000	,000		,000
	N	794	794	794	791
Peso230dpe	Correlación de Pearson	,461**	,473**	,959**	1
	Sig. (bilateral)	,000	,000	,000	
	N	791	791	791	791

** . La correlación es significativa en el nivel 0,01 (bilateral).

Tabla 14. Rendimiento canal y filete de las doradas de los dos orígenes diferentes (IFAPA + ULPGC e IEO Murcia)

	Rendimiento canal (%)		Rendimiento filete (%)	
	AND-CAN	MUR	AND-CAN	MUR
Media	93,5	93,1	43,1	40,7
Mediana	93,6	93,2	43,4	230
Desviación estándar	1,11	1,31	3,31	24,7
Error estándar	0,05	0,09	0,23	0,43
Mínimo	89	89	33	32
Máximo	97	96	54	52

El peso del pez tuvo un efecto sobre estos caracteres, de tal forma que por cada gramo que aumentaba el peso del pez el rendimiento canal disminuía en 0.003% y el rendimiento filete aumentaba en 0.02%.

La presencia de malformaciones fue muy baja, los peces AND-CAN presentaron 0,5% de malformaciones de columna y 0,7% en el opérculo, mientras que los peces MUR presentaron un 3,7% de malformaciones de columna y 0% en opérculo.

Respecto al análisis fotográfico mediante el programa IMAFISH se realizaron fotografías de 800 doradas que se tienen que analizar (figura 9).



Figura 9. Fotografía de dorada para el programa IMAFISH

Tarea A.1-3. ANÁLISIS DE PATERNIDAD

Participantes: IFAPA – ULPGC – UPCT

Los reproductores del IEO han sido genotipados para los marcadores microsatélites de la multiplex SMsa1. Con este fin, inicialmente se extrajo el ADN de la aleta caudal, que se mantenía en etanol absoluto a temperatura ambiente, mediante el kit EZNA Forensic (OMEGA). La calidad y cantidad del ADN se determinó mediante el espectrofotómetro *NanoDrop 2000 v.3.7* (Thermo Fisher Scientific, Wilmington, U.S.A.). Para el genotipado individual se utilizó la multiplex SMsa1 (Super Multiplex Sparus aurata), descrita en Lee-Montero et al. (2013) y diseñada con 11 marcadores microsatélites (Tabla 15).

Tabla 15. Información genética del SuperMultiplex en dorada (SMsa1): código interno, nombres de locus, grupo de ligamiento (LG), número de acceso a loci en GenBank (GENBANK), fluorocromo, motivo de nucleótido y concentración de cebador para cada marcador de microsatélite

	Internal code	Locus	LG	GENBANK	Fluorochrome	Nucleotide motif	Concentration (µM)
1E	E 1	Bd-68-T	23	DQ851270	5' 6-FAM	(GT)10	0,02
3C	C 3	Eld-39-T	6	DQ851367	5' 6-FAM	(TG)27	0,06
4D	D 4	P3	1	DQ851284	5' 6-FAM	(TG)25	0,09
4E	E 4	Bld-18-F	11	DQ851280	5* NED	(AC)13*	0,06
5A	A 5	Bt-14-F	20	DQ851293	5* NED	(CA)15	0,03
5M	M 5	Ct27	24	DQ851320	5* NED	(TAGA)15	0,08
11L	L 11	Dld-16-F	10	DQ851339	5' PET	(GT)14	0,07
6F	F 6	Hd-25-F	3	DQ851392	5* PET	(GT)15*	0,09
11D	D 11	Cld-29-T	5	DQ851308	5* VIC	(GT)16	0,03
12C	C 12	Dt47	18	DQ851347	5* VIC	(CT)19*	0,03
9I	I 9	At37	19	DQ851250	5* VIC	(TAGA)13	0,04

Las condiciones de la PCR consistieron en una desnaturalización inicial a 95 ° C durante 10 minutos, seguida de 28 ciclos de 94 ° C durante 30 segundos, 60 ° C durante 1 minuto y 72 ° C durante 1 minuto, con una extensión final de 72 ° C durante 7 min. Se llevaron a cabo reacciones en un volumen final de 12,5 µl con las concentraciones de los diferentes componentes que se muestran en la tabla 16.

Tabla 16. Los componentes y las concentraciones respectivas de la PCR utilizada en Lee-Montero et al. (2013).

Components	Stock	Final	µl per sample
	Concentration	Concentration	
GeneAmp PCR Buffer II without MgCl ₂ (AB Cat.: N808-0130)	-----	-----	1,25
MgCl ₂ solution	25 mM	1,5-3 mM	1,5
dNTP Mix (Amerham: US77119-500UL)	Dilute it to have a mix with 10 mM	200 µM	0,25
PCR primer stock	mix de primers	0,02-0,08 µM	2
AmpliTaq Gold	5 unit / µl	0.5 units/12.5µl	0,1
Template DNA	± 20 ng/µl	± 20 ng /12.5µl	1
ddH ₂ O	-----	-----	6,4
Total			12,5

Los electrofenogramas fueron analizados mediante GeneMapper software v.3.7 (Life Technologies®). Los microsatélites utilizados fueron muy polimórficos, el número de alelos por marcador microsatélite fue bastante elevado, con valores comprendido entre 9 y 23 alelos por microsatélites en la población de los reproductores. Se observa también que a mayor número de alelos por microsatélite, la heterocigosidad fue mayor.

Tabla 17. Información genética de la SuperMultiplex en dorada (SMSa1) en los reproductores del IEO: rango de tamaño de los alelos, número de alelos, heterocigosidad observada y esperada para cada marcador microsatelite

Microsatélite	Tamaño de los alelos (pb)	Nº Alelos	Heterocigosidad observada	Heterocigosidad esperada
E1	58-90	14	1.000	0.899
C3	98-156	23	0.969	0.878
D4	173-221	18	0.796	0.880
E4	70-88	10	0.938	0.878
A5	100-118	9	0.489	0.601
M5	126-200	15	0.925	0.867
L11	99-119	9	0.464	0.536
F6	126-156	12	0.701	0.763
D11	56-92	12	0.907	0.868
C12	105-137	15	0.918	0.826
I9	138-190	19	0.832	0.844

En promedio, en la población de los reproductores la heterocigosidad observada fue $0,81 \pm 0,06$ y la heterocigosidad esperada $0,80 \pm 0,04$.

Tarea A.1-4. ESTIMACIÓN DE PARÁMETROS GENÉTICOS

Participantes: ULPGC – IFAPA - UPCT

En la tabla 18, se muestran los valores de heredabilidad, así como las correlaciones genéticas y fenotípicas para los caracteres de crecimiento, rendimiento y calidad de la carne y morfológica del pez, esta última determinada a través del programa IMAFISH_ML (Navarro et al., 2016), donde se pueden ver las referencias de todos los acrónimos. Como se puede apreciar, los caracteres de crecimiento presentaron heredabilidades entre moderadas y medias. Los caracteres de rendimientos mostraron heredabilidades medias. Mientras que los caracteres de calidad de la carne presentaron heredabilidades bajas, los de calidad morfológica fueron altas o muy altas, excepto la presencia-ausencia de cualquier tipo de deformidad que fue claramente baja.

En la tabla 19, para los caracteres de crecimiento, se estimaron las correlaciones genéticas por carácter entre sistema de cultivo. Estimándose así, el grado de interacción genotipo-ambiente (familia-sistema de cultivo), para lo cual sólo se utilizaron familias que estuviesen presentes con al menos 4 descendientes en todos los sistemas de cultivo: Jaulas oceánicas (AQUANARIA), Estero (PIMSA), Tanques insulares (AQUANARIA), Tanques continentales (IFAPA).

Tabla 18. Estimaciones de las heredabilidades (en la diagonal), correlaciones genéticas (encima de la diagonal) y correlaciones fenotípicas (debajo de la diagonal), para yentre, respectivamente, caracteres de crecimiento, rendimiento y calidad de la carne y morfológica

	AF2	PESO CANAL	% CANAL	ATL	PESO FILETE	FFM	HUMEDAD	CF	ALA	ALE	ALB	ALD	ALC	ALCA	GRASA VISCERAL	% FILETE	LF	GRASA MUSCULAR	DEFORMIDAD	PROTEINA MUSCULAR	LONGITUD	PESO
AF2	0,17±0,06	0,76±0,10	-0,58±0,19	0,77±0,10	0,75±0,11	0,52±0,18	-0,23±0,23	0,33±0,25	0,83±0,08	0,21±0,27	0,77±0,11	0,63±0,15	0,82±0,09	0,76±0,11	0,62±0,12	0,83±0,12	0,76±0,11	0,56±0,15	0,45±0,49	-0,08±0,25	0,74±0,11	0,69±0,12
PESO CANAL	0,36	0,48±0,08	-0,60±0,18	1,00±0,00	1,00±0,00	0,53±0,16	-0,50±0,15	0,53±0,17	0,97±0,01	0,21±0,17	0,93±0,02	0,91±0,05	0,98±0,01	0,98±0,01	0,82±0,06	0,79±0,13	0,98±0,01	0,56±0,14	0,13±0,32	-0,10±0,21	0,96±0,02	1,00±0,00
% CANAL	-0,01	0,01	0,08±0,03	-0,61±0,14	-0,60±0,17	-0,21±0,26	0,05±0,24	-0,62±0,18	-0,59±0,19	0,06±0,29	-0,64±0,17	-0,56±0,16	-0,67±0,17	-0,55±0,19	-0,94±0,05	0,05±0,30	-0,51±0,21	-0,44±0,24	-0,27±0,40	0,20±0,24	-0,39±0,22	-0,51±0,16
ATL	0,33	0,93	-0,07	0,43±0,08	1,00±0,00	0,62±0,14	-0,52±0,15	0,48±0,20	0,93±0,02	0,20±0,11	0,95±0,02	0,83±0,07	0,99±0,01	0,98±0,01	0,82±0,06	0,80±0,13	0,97±0,01	0,66±0,13	-0,08±0,25	-0,06±0,21	0,97±0,01	1,00±0,00
PESO FILETE	0,36	0,94	-0,02	0,87	0,45±0,08	0,54±0,12	-0,51±0,15	0,55±0,17	0,97±0,02	0,19±0,14	0,95±0,02	0,88±0,04	0,98±0,01	0,97±0,01	0,78±0,07	0,75±0,12	0,98±0,01	0,60±0,14	0,12±0,32	-0,04±0,20	0,95±0,02	1,00±0,00
FFM	0,23	0,39	0,01	0,30	0,38	0,40±0,11	-0,89±0,09	0,19±0,18	0,64±0,16	0,71±0,16	0,42±0,16	0,76±0,10	0,56±0,14	0,61±0,15	0,51±0,16	0,53±0,36	0,77±0,15	0,84±0,12	0,27±0,45	-0,18±0,21	0,44±0,17	0,46±0,13
HUMEDAD	-0,08	-0,23	-0,02	-0,22	-0,25	-0,29	0,14±0,05	-0,25±0,20	-0,62±0,16	-0,51±0,21	-0,51±0,18	-0,62±0,15	-0,41±0,14	-0,47±0,15	-0,23±0,18	-0,41±0,25	-0,57±0,19	-0,96±0,04	-0,16±0,33	0,55±0,19	-0,26±0,15	-0,36±0,15
CF	-0,02	0,17	-0,18	0,08	0,14	0,25	-0,08	0,25±0,05	0,34±0,20	0,71±0,17	0,54±0,16	0,66±0,17	0,57±0,18	0,52±0,19	0,62±0,12	-0,04±0,29	0,28±0,23	0,17±0,27	0,55±0,20	-0,05±0,19	0,22±0,17	0,54±0,12
ALA	0,38	0,90	-0,08	0,94	0,83	0,34	-0,24	0,14	0,60±0,09	-0,07±0,13	0,98±0,01	0,31±0,11	0,81±0,06	0,90±0,04	0,73±0,08	0,84±0,10	0,93±0,04	0,67±0,15	0,05±0,33	-0,23±0,24	0,88±0,05	0,86±0,04
ALE	0,04	0,43	-0,01	0,50	0,39	0,21	-0,18	0,25	0,40	0,63±0,50	-0,05±0,13	0,62±0,12	0,07±0,15	0,08±0,15	0,20±0,14	0,21±0,47	-0,05±0,879	0,40±0,23	0,81±0,12	0,07±0,29	0,10±0,14	0,16±0,15
ALB	0,36	0,90	-0,09	0,95	0,84	0,28	-0,23	0,18	0,96	0,41	0,58±0,09	0,45±0,10	0,90±0,02	0,98±0,01	0,78±0,07	0,80±0,11	0,92±0,04	0,58±0,17	0,04±0,33	-0,02±0,25	0,94±0,03	0,96±0,02
ALD	0,28	0,78	-0,05	0,80	0,73	0,33	-0,22	0,29	0,61	0,50	0,67	0,41±0,08	0,75±0,10	0,89±0,05	0,77±0,07	0,66±0,18	0,86±0,08	0,78±0,10	0,34±0,23	-0,35±0,19	0,69±0,10	0,85±0,06
ALC	0,33	0,92	-0,08	0,96	0,85	0,33	-0,21	0,26	0,88	0,42	0,94	0,83	0,51±0,08	0,97±0,01	0,82±0,06	0,73±0,13	0,95±0,02	0,61±0,14	-0,01±0,27	-0,07±0,20	0,93±0,03	0,98±0,01
ALCA	0,08	0,87	-0,07	0,94	0,79	0,29	-0,20	0,16	0,91	0,44	0,94	0,77	0,92	0,41±0,08	0,77±0,08	0,75±0,13	0,95±0,02	0,56±0,14	-0,06±0,27	0,07±0,20	0,96±0,02	0,97±0,01
GRASA VISCERAL	0,23	0,60	-0,20	0,57	0,56	0,26	-0,10	0,21	0,55	0,28	0,57	0,48	0,57	0,53	0,42±0,07	0,17±0,23	0,77±0,08	0,39±0,17	0,31±0,28	-0,01±0,17	0,69±0,09	0,80±0,06
% FILETE	0,24	0,34	0,17	0,31	0,60	0,19	-0,20	-0,13	0,32	0,13	0,30	0,27	0,30	0,25	0,13	0,11±0,29	0,89±2,51	0,25±0,29	-0,45±0,35	0,29±0,34	0,82±0,13	0,67±0,16
LF	0,33	0,88	-0,05	0,97	0,82	0,32	-0,22	-0,09	0,91	0,40	0,91	0,71	0,90	0,90	0,52	0,33	0,37±0,25	0,69±0,14	-0,12±0,32	-0,06±0,27	1,00±0,00	0,98±0,02
GRASA MUSCULAR	0,12	0,21	0,02	0,18	0,24	0,38	-0,78	0,08	0,19	0,08	0,19	0,19	0,20	0,17	0,09	0,20	0,17	0,14±0,05	-0,07±0,39	-0,64±0,16	0,29±0,21	0,42±0,16
DEFORMIDAD	-0,22	-0,19	-0,01	-0,27	-0,21	0,00	0,02	0,61	-0,26	-0,08	-0,21	-0,08	-0,14	-0,19	-0,09	-0,23	-0,34	-0,01	0,03±0,02	0,67±0,39	-0,30±0,22	-0,06±0,22
PROTEINA MUSCULAR	0,04	0,10	-0,00	0,12	0,08	0,02	0,55	0,04	0,08	0,08	0,11	0,06	0,11	0,11	0,10	-0,04	0,11	-0,70	-0,04	0,15±0,06	0,04±0,19	0,01±0,18
LONGITUD	0,51	0,94	-0,03	0,92	0,88	0,35	-0,23	-0,29	0,80	0,45	0,89	0,74	0,87	0,87	0,58	0,38	0,94	0,19	0,13	0,13	0,23±0,04	0,93±0,02
PESO	0,38	0,99	-0,11	0,94	0,94	0,40	-0,23	0,11	0,90	0,48	0,93	0,81	0,93	0,90	0,65	0,32	0,90	0,21	-0,28	0,13	0,90	0,36±0,05

Tabla 19. Estimaciones de las correlaciones genéticas del mismo carácter a la edad de sacrificio (Peso, longitud y factor de condición), entre sistema de cultivo (Jaulas, Esteros y Tanques).

PESO AL SACRIFICIO (talla ración)			
	JAULA - AQUANARIA	ESTERO - PIMSA	TANQUE - IFAPA
TANQUE - AQUANARIA	0,84 ± 0,09	0,44 ± 0,26	0,67 ± 0,16
JAULA - AQUANARIA		0,58 ± 0,24	0,87 ± 0,10
ESTERO - PIMSA			0,90 ± 0,10
LONGITUD AL SACRIFICIO (talla ración)			
	JAULA - AQUANARIA	ESTERO - PIMSA	TANQUE - IFAPA
TANQUE - AQUANARIA	0,69 ± 0,17	0,36 ± 0,28	0,51 ± 0,24
JAULA - AQUANARIA		0,50 ± 0,27	0,76 ± 0,20
ESTERO - PIMSA			0,99 ± 0,03
FACTOR DE CONDICIÓN AL SACRIFICIO (talla ración)			
	JAULA - AQUANARIA	ESTERO - PIMSA	TANQUE - IFAPA
TANQUE - AQUANARIA	0,92 ± 0,09	0,63 ± 0,23	0,78 ± 0,18
JAULA - AQUANARIA		0,99 ± 0,13	0,94 ± 0,08
ESTERO - PIMSA			0,97 ± 0,06

Tarea A.1-5. OPTIMIZACIÓN DE LA CONTRIBUCIÓN FAMILIAR

Participantes: ULPGC - IFAPA

Se han realizado puestas masales con huevos de cuatro días consecutivos (4DL), en distintos momentos del periodo de puesta, tanto a partir de reproductores de élite y control existente en IFAPA y ULPGC, estableciendo así diferentes siembras (S1, al inicio del periodo de puesta; S3, a las tres semanas de distancia de la toma de la siembra S1). En el caso del IEO, se establecieron siembras 4DL pero no seleccionadas ya que el stock de reproductores nunca ha sido sometido a un proceso de selección genética mediante índices de selección sintético. Estos lotes son aquellos a los que se hace mención en la actividad A.1.

En la tabla 20 se muestran todas las estimaciones de variación genética (heterocigosidad, Hardy-Weinberg y Fst), solamente en los reproductores de élite. En relación a la heterocigosidad, la siembra S1 presentó más variabilidad que el lote S3 (67,95% y 60,98%, respectivamente). Siendo la heterocigosidad observada de 67,23%. Para la siembra S1, el rango estuvo entre 30,1% y 85,03% para los *loci* 8 y 9, respectivamente. Para la siembra S3, el rango estuvo entre 27,78% y 84,72% for *loci* 6 and 3, respectivamente. Respecto al equilibrio de Hardy-Weinberg, todos los *loci* presentaron desequilibrio en la población total, excepto los *loci* 2 y 8. Este fue el cuadro que presentó la siembra S1, sin embargo, la siembra S3 mostró equilibrio para todos los *loci*, excepto los *locus* 9 y *locus* 10. El grado de diferenciación entre ambas siembras S1 y S3 fue del 3,78%.

Tabla 20. Estimaciones de la variación genética. Table of estimations of genetic variation. Heterocigosidad (%), Hardy-Weinberg (HW) and F_{st} .

		Loc1	Loc2	Loc3	Loc4	Loc5	Loc6	Loc7	Loc8	Loc9	Loc10	Loc11	Mean
S ₁	Het _{ob} (%)	78,3	65,3	80,2	70,8	76,3	51,7	84,8	30,1	85,0	79,7	47,2	67,9
	Het _{esp} (%)	84,8	71,9	79,1	63,7	73,5	48,8	79,0	27,9	78,7	76,3	52,5	66,7
	N	1172	1154	1176	1172	1176	1176	1176	1176	1176	938	1176	1152
	HW	***	0,05	***	***	***	*	***	0,17	***	***	***	***
S ₃	Het _{ob} (%)	69,4	69,4	84,7	45,8	66,6	27,7	70,8	33,3	75	80,5	56,9	60,9
	Het _{esp} (%)	70,4	66,0	76,6	51,2	66,7	29,0	71,5	29,6	75,1	75,5	51,6	59,6
	N	144	144	144	144	144	144	144	144	144	72	144	160
	HW	0,21	0,22	0,07	0,22	0,54	0,16	0,77	0,88	*	**	0,05	**
Total	HW	***	0,06	***	***	***	*	***	0,44	***	***	***	***
	F_{st}	0,0378											

En cuanto a la contribución familiar según el tipo de siembra (S1 y S3), los resultados se muestran en la tabla 21. Considerando sólo los reproductores de élite, 28 fueron los contributivos (3 machos y 25 hembras), con 59 familias de hermanos carnales y 27 familias de medios hermanos en ambas siembras.

En la siembra S1, 27 peces de élite (3 machos y 24 hembras) contribuyeron para producir un total de 52 familias de hermanos carnales, y 26 familias de medios hermanos. En la siembra 3, 21 peces de élite (dos machos y 19 hembras) contribuyeron para producir 23 familias de hermanos carnales y 21 familias de medios hermanos. También, en la siembra 3, diez peces control (5 hembras y 5 machos) contribuyeron para producir un total de 8 familias de hermanos carnales y 7 familias de medios hermanos. Los resultados de la siembra S3 fueron descompuestos en élite y control, debido a que pertenecieron a diferentes stocks de reproductores. Así, en la siembra control S3 sólo fueron utilizados 12 descendientes para estimar la contribución familiar.

El número medio de descendientes por familia de hermanos carnales, así como su desviación estándar y números máximos y mínimos se muestran en la tabla 22.

Table 21. Número total de reproductores (tB), número de reproductores contributivos a la puesta (cB), por siembra y sexo, y el número de familias de hermanos carnales (FS) y de medios hermanos (HS). Nd, no determinado.

			Total reproductores (tB)	Reproductores contributivos (cB)	Familias de hermanos carnales (FS)	Familias de medios hermanos (HS)
S ₁	Elite	♂	Nd	3	-	3
		♀	Nd	24	-	23
		TOTAL		27	52	26
S ₃	Elite	♂	Nd	2	-	2
		♀	Nd	19	-	19
		Subtotal		21	23	21
	Control*	♂	Nd	5	-	4
		♀	Nd	5	-	3
Subtotal		10	8	7		
TOTAL			31	31	24	
S ₁	Total	♂	Nd	3	-	3
& S ₃	Elites	♀	Nd	25	-	24
TOTAL				28	59	27

* La siembra control S3 contributiva fue utilizadas con solo 12 descendientes.

Table 22. Media de descendientes por familia de hermanos carnales, y su desviación estándar y número de descendientes máximo y mínimo.

		Nº descendientes por FS*	Desviación estándar por FS	Máximo** nº de descendiente por FS
S1	Elite	9,71	9,72	44
S3	Elite	2,74	3,60	18
S3	Control	1,5	0,5	2

*FS, familia de hermanos carnales. ** El nº mínimo de descendientes por familia fue 1.

Tarea A.1-6. BANCO DE MUESTRAS

Participantes: ULPGC – IFAPA – UPCT - IEO

Se ha establecido el banco de muestras de la F3 del programa de selección genética PROGENSA, de momento para un total de 2.400 muestras pertenecientes a la clase año 2016, sembrada y ya muestreada por IFAPA y ULPGC, así como para la clase año 2017, sobre papel tipo Whatman o tarjetas FTA. Contribuyendo así a disponer una copia de todas las muestras con registro productivo a escala industrial, al objeto de posteriores análisis con la evolución de las herramientas de biología molecular, como es el caso de la producción de nuevos SNP-chips, en proyectos como PerformFISH (WP1), para posibles estrategias de selección genómica.

ACTIVIDAD-A.2

O4. Explorar el efecto de dietas altamente eficientes en términos de crecimiento en familias de alto, medio y bajo valor genético para el peso al sacrificio de PROGENSA® mediante el empleo de marcadores moleculares de alteraciones del crecimiento y del metabolismo lipídico para su implementación en programas de selección genética asistida.

Tarea A.2-1. INTERACCIÓN NUTRICIÓN-GENOMA

Participantes: CSIC – ULPGC – IFAPA - IEO

El objetivo básico de la Actividad A-2 ha sido explorar el efecto de la interacción nutrición genoma sobre parámetros de crecimiento, utilizando para ello dietas basadas en las formulaciones del Proyecto Europeo ARRAINA. Estudios previos, con formulaciones con un alto nivel de sustitución de harinas y aceites de pescado por ingredientes vegetales, muestran que es posible disminuir el nivel de inclusión de ingredientes marinos por debajo del 10% sin efectos sobre el crecimiento desde los primeros estadios del engorde hasta completar el ciclo de producción (Benedito-Palos et al., 2016; Simó-Mirabet et al., 2018). Como efectos negativos cabe destacar una respuesta inflamatoria y cambios en la proporción de sexos, como consecuencia de un proceso de pseudo-feminización que favorece la reversión de machos a hembras en animales de 2-4 años en ausencia de hembras con una alta capacidad reproductiva “super-girls”. Total o parcialmente, estos efectos negativos son revertidos por la suplementación de las dietas extremas con butirato. Este ácido graso de cadena corta es de acción multi-trópica y revierte los cambios observados en la proporción de sexos, a la vez que limita la progresión de enfermedades en modelos de infección bacteriana y/o parasitaria. A su vez, estos cambios van acompañados de una reversión al fenotipo salvaje (propio de animales con ingesta lata de ingrediente marinos), que se pone de manifiesto al analizar la microbiota intestinal, el proteoma del mucus, el transcriptoma intestinal y/o medidas histológicas y de electrofisiología de integridad del epitelio intestinal (Estensoro et al., 2016; Piazzon et al., 2016, 2017). Estas aproximaciones de carácter claramente holístico también se han complementado mediante estudios de metabolómica (wide-approach), en los que se ha puesto de manifiesto el efecto de la dieta sobre un elevado número de metabolitos-iones circulantes (Gil-Solsona et al., 2019).

Sin embargo, permanecen prácticamente inexplorados los efectos de los resultados de la selección por crecimiento sobre una diferente utilización de dietas de alto y bajo contenido en harinas y aceites de pescado. Es por ello, que en el actual proyecto PROGENSA-III, se ha contemplado estudiar el efecto de una formulación estándar y otra de niveles bajos e intermedios de harinas y aceites, respectivamente. Esta formulación conservativa se ha elegido

para obviar la necesidad de adicionar butirato u otros aditivos equivalentes, aunque la formulación testada sigue siendo más extrema que la de las actuales dietas comerciales.

METODOLOGÍA & PLAN DE TRABAJO

Dietas

Dos dietas isoproteicas e isolípídicas con diferentes niveles de inclusión de harina (FM) y aceite (FO) de pescado fueron formuladas y fabricadas por BioMar-UK (Tabla 23). La dieta D1 contuvo un 23% de harinas de origen marino, mientras que en la dieta D2 el nivel de inclusión se redujo al 3%. El nivel de inclusión de FO en la D1 fue del 14.1% y del 3.9% en la D2, disminuyendo el contenido de EPA+DHA del 3.8% al 1.2%. El contenido en lisina, metionina, colina, lecitina y fosfato monocálcico de las dietas D1-D2 se balanceó convenientemente con la adición del mix de vitaminas y minerales.

Tabla 23. Ingredientes y composición de las dietas experimentales.

Ingredient (%)	D1	D2
Fish meal	23,0	3,0
Fish hydrolysate (CPSP)	2,0	2,0
Soya protein	16,7	25,6
Corn gluten	16,5	25,5
Wheat gluten	10	7,3
Rapeseed cake	12	10
Wheat	10	7,4
Fish oil	14,1	3,9
Rapeseed oil	0	9
Mineral-vitamin mix ¹	1,25	6,3
<i>Proximate composition (%)</i>		
Moisture	7,9	7,5
Crude protein	45	45
Crude fat	20,1	20,1
Ash	6,9	5,9
NFE ²	19,1	19,8
ARA ³	0,17	0,05
EPA ⁴	2,30	0,60
DHA ⁵	1,50	0,42
EPA+DHA	3,8	1,02

¹Contiene vitaminas, minerales, aminoácidos, colesterol, lecitina y antioxidantes. ² extracto libre de nitrógeno. ³ácido araquidónico (20:4n-6). ⁴ácido eicosapentaenoico (20:5n-3). ⁵ácido docosahexaenoico (20:6n-3).

Selección de progenitores –Larvario y pre-engorde

Peces seleccionados por alto (3 hembras y 3 machos) y bajo (3 hembras y seis machos) crecimiento a lo largo del programa PROGENSA, se utilizaron como progenitores en las instalaciones de cultivo del IFAPA para la obtención de familias con un diferente potencial de crecimiento y bagaje genético. El análisis posterior de asignación parental reveló una diferente contribución de los progenitores que quedó reducida a 3 hembras y 2 machos en el grupo “elite” (exey) y a 2 hembras y 6 machos en el grupo control o de bajo potencial de crecimiento (cxcy) (ver ANEXOB, para más detalle).

El larvario de ambos lotes se desarrolló en el IEO de Murcia y las larvas recién destetadas se trasladaron al IATS-CSIC (Fig. 10). El pre-engorde se llevó a cabo en un sistema de recirculación de agua de mar en condiciones controladas de temperatura (<23°C). Con 3-6 g se transfirieron los peces a tanques de 3000 L en régimen de circuito abierto. Durante este periodo inicial en el IATS, los peces fueron alimentados con piensos comerciales de diferente tamaño de granulo:

- 0.2-0.3 mm Skretting Gemma Wean
- 0.5 mm Skretting Gemma Wean Diamond
- 0.8 mm Skretting Perla Plus 2.0
- 1.5 mm Biomar Intro Plus MT.



Figura 10. Cronograma de cruzamientos y del larvario y pre-engorde en el IEO de Murcia e instalaciones del IATS-CSIC.

Engorde IATS “common garden”

A los 180 dph (septiembre 2017), 2545 peces fueron marcados con Pit-tags (ID-100A 1.25 Nano Transponder, Trovan) y cada uno de los dos lotes se distribuyó inicialmente en 6 tanques de 3000 L, que se desdoblaron en otros 4 adicionales a lo largo del periodo de engorde con una densidad de cultivo que osciló entre 2.5 y 12 kg/m³ desde el inicio al final del engorde. Durante las 3 primeras semanas, todos los peces se alimentaron con una mezcla (1:1) de las dos dietas experimentales (D1, D2; 1.5 mm) como adaptación al régimen de alimentación. Tras lo cual, se establecieron dos grupos de peces con alimentación diferente, de acuerdo con un modelo

“common garden” en el que estaban igualmente representados los lotes de alto y bajo crecimiento en cada una de las réplicas (3-5 réplicas/dieta). El pienso, con un tamaño de pellet de 1,9, 3 ó 4,5 mm, se distribuyó mediante comederos automáticos. La ración se ajustó semanalmente a un nivel próximo a la saciedad, variando el número de ingestas diarias entre 1 y 2, dependiendo del tamaño y de la temperatura del agua (estación).

De forma periódica (noviembre 2017, abril 2018, mayo 2018, julio 2018, septiembre 2018), se muestrearon todos los animales de la población para el registro de peso y talla de forma semi-automatizada con el Fish-Reader de Trovan (Fig. 2). Coincidiendo con el primer muestreo de noviembre, se tomarán muestras de aletas para el genotipado de los animales (ULPGC, CSIC) con 11 marcadores de microsatélites. Se consiguió de forma inequívoca la asignación parental del 96% de la población y el 4% de peces sin asignación parental fue eliminado del estudio, en el primer muestreo después del período invernal (abril del 2018).



Figura 11. Cronograma de muestreos en las instalaciones de cultivo del IATS-CSIC.

Selección de familias para nuestros de tejidos y tests funcionales

En base al crecimiento de septiembre 2017 a abril 2018 y a la diferente contribución genética a la variabilidad total de la población, se seleccionaron 5 familias (c2c7, c4c3, e4e1, e5e2, e6e2) para la toma de muestras de sangre y tejidos y cálculo de índices hepáticos, de grasa visceral e intestinal (Fig. 12). Muestras de estos mismos tejidos se tomaron para histología y análisis de expresión génica y de la microbiota intestinal, aunque esto último no estaba previsto en la propuesta del proyecto.

Adicionalmente, animales de familias c4c3, e4e1 y e5e2 se utilizaron para tests de ejercicio y retos infeccioso con el parásito intestinal *Enteromyxum leei* (Actividad A-3).

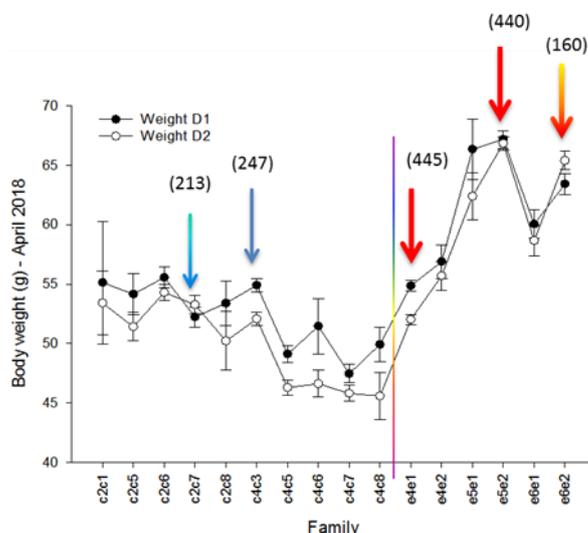


Figura 12. Peso medio de las familias en cultivo con cada una de las dietas experimentales en abril 2018. Las flechas indican las familias seleccionadas para muestreos y tests ulteriores. (), número de individuos de las familias seleccionadas.

Expresión génica

El ARN total hepático de las 5 familias (c2c7, c4c3, e4e1, e5e2, e6e2) de los ensayos de expresión génica se extrajo mediante el kit *MagMax* (*Life Technologies*), que permite una buena recuperación de ARN de calidad para ensayos de PCR, *microarrays* y ARN-seq. La transcripción reversa de aproximadamente 500 ng de ARN total se llevó a cabo con el kit *High-capacity cDNA archive* (*Applied Biosystems*). Como gene *housekeeping* se utilizó la B-actina con una variación de Ct inter-individuos de menos de 0.5 ciclos tras la amplificación por PCR de 660 pg de ADN total (25 ul) en placas de 96 con 2 x *SYBR Green Master Mix* (*Bio-Rad*) y cebadores específicos a una concentración final de 0.9 uM. El programa de PCR incluyó una fase inicial de desnaturalización a 95°C durante 3 min, seguida de 40 ciclos de desnaturalización durante 15 segundos a 95°C y una fase de anillado y extensión de 60 segundos a 60°C. La especificidad de la reacción se comprobó mediante análisis de las curvas de melting. Para los análisis de los datos de expresión, todos los datos se refirieron al nivel de expresión de la IGFBP-2a de familia c4c3, a la que de forma arbitraria se le asignó un valor de 1.

Todas las manipulaciones de pipeteo y procesado de muestras se realizaron de forma semi-automatizada con la ayuda de un robot (5075 *Liquid Handling Robot*, Eppendorf), lo que permite una cuantificación simultánea y altamente reproducible de todos los marcadores incluidos en el array de 30 genes, en el que se incluyeron marcadores de metabolismo lipídico (16), energético (5) y del eje GH/IGF (8) (Tabla 2). Gran parte de estos marcadores proceden de las bases de datos del transcriptoma y genoma de dorada del IATS-CSIC (www.nutrigroup-iats.org/seabreamdb).

Tabla 23. Diseño del PCR-array de 30 genes, incluida la B-actina como gen *housekeeping*.

GENE NAME/CATEGORY	SYMBOL	GENBANK
Lipid metabolism		
Elongation of very long chain fatty acids 1	ELOVL1	JX975700
Elongation of very long chain fatty acids 4	ELOVL4	JX975701
Elongation of very long chain fatty acids 5	ELOVL5	AY660879
Elongation of very long chain fatty acids 6	ELOVL6	JX975702
Fatty acid desaturase 2	FADS2	AY055749
Stearoyl-CoA desaturase 1a	SCD1a	JQ277703
Stearoyl-CoA desaturase 1b	SCD1b	JQ277704
Hepatic lipase	HL	EU254479
Lipoprotein lipase	LPL	AY495672
Adipose triglyceride lipase	ATGL	JX975711
85kDa calcium-independent phospholipase A2	PLA2G6	JX975708
Cholesterol 7-alpha-monooxygenase	CYP7A1	KX122017
Carnitine palmitoyltransferase 1A	CPT1A	JQ308822
Peroxisome proliferator-activated receptor α	PPAR α	AY590301
Peroxisome proliferator-activated receptor β	PPAR β	AY590304
Peroxisome proliferator-activated receptor γ	PPAR γ	KY388508
Energy Metabolism		
Citrate synthase	CS	JX975229
Proliferator-activated receptor gamma coactivator 1 alpha	PGC1 α	JX975264
Sirtuin 1	SIRT1	KF018666
Sirtuin 2	SIRT2	KF018667
Uncoupling protein 1	UCP1	FJ710211
GH/IGF System		
Growth hormone receptor I	GHR-I	AF438176
Growth hormone receptor II	GHR-II	AY573601
Insulin-like growth factor-I	IGF-I	AY996779
Insulin-like growth factor-II	IGF-II	AY996778
Insulin-like growth factor binding protein 1b	IGFBP-1b	MH577189
Insulin-like growth factor binding protein 2a	IGFBP-2a	MH577190
Insulin-like growth factor binding protein 2b	IGFBP-2b	AF377998
Insulin-like growth factor binding protein 4	IGFBP-4	KM658998

Tests de ejercicio en cámaras metabólicas

Peces de las familias c4c3, e4e1 y e5e2 se sometieron a tests de esfuerzo en un túnel de natación de 10 L de capacidad (*Loligo® Systems, Viborg*, Dinamarca), sumergido en una cámara de agua para mantener controlada la temperatura durante toda la experimentación (Fig. 4). La calidad de agua se controló mediante un sistema de recirculación de agua de mar equipado con filtración mecánica y biológica, y un sistema automatizado de control de temperatura (24–25°C). Durante toda la experimentación se comprobó que los niveles de amonio, nitritos y nitratos

permanecieron en valores indetectables. La velocidad del flujo de agua, los recambios de agua y la captura de datos se llevaron a cabo de forma automatizada (*DAQ-M instrument; AutoResp™ software, Loligo® Systems*). La saturación de oxígeno dentro del respirómetro se cuantificó mediante un electrodo (Witrox 1 single-channel oxygen meter, Loligo® Systems, Viborg, Denmark), equipado con un microsensado de fibra óptica (NTH, PreSens-Precision Sensing GmbH, Regensburg, Germany) y una sonda de temperatura (HTF50 Pt1000 1/3DIN, S+S Regeltechnik GmbH; Nürnberg, Germany).

Los peces testados ayunaron durante la noche anterior a la experimentación, y fueron ligeramente anestesiados con MS-222 (0.1 g/L) como paso previo a la introducción en la cámara de natación. Una vez dentro, se aclimataron al sistema a velocidad baja (0.50 BL/s), hasta que el consumo de O₂ (MO₂) se estabilizó en 30-45 min en 220-240 mgO₂/kg/h. Tras lo cual, la velocidad del agua en el túnel aumentó de forma escalonada (0.5 BL/s) cada 5 min hasta que el pez no pudiese sostener su actividad natatoria y quedase exhausto. Las mediciones de la concentración de oxígeno se efectuaron cada segundo y el cálculo de MO₂ se realizó automáticamente mediante el software AutoResp™. La velocidad crítica de natación (U_{crit}) se calculó mediante la siguiente ecuación: $U_{crit} = u_{high} + [(t_{exh} / t_{inter}) * u_{incr}]$, donde u_{high} es la velocidad máxima que se sostuvo durante todo el intervalo, t_{exh} es el intervalo que el pez estuvo a la velocidad de agotamiento, t_{inter} es el intervalo de natación (5 min), y u_{incr} es el incremento de velocidad en cada paso (0.5 BL/s).

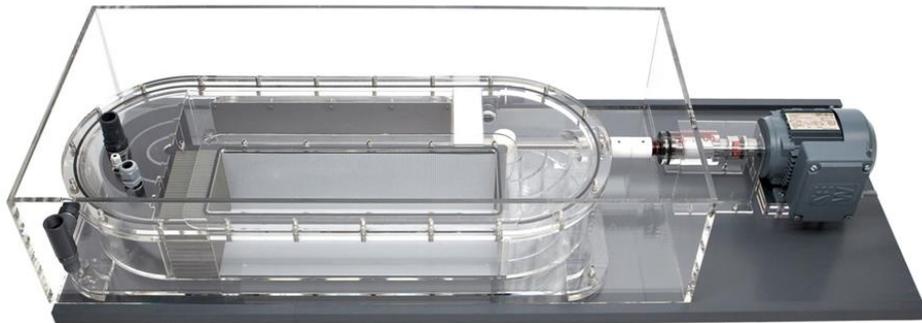


Figura 13. Cámara metabólica/respirometro (Loligo® Systems) para mediciones de consumo de O₂ en peces sometidos a diferentes grados de actividad física.

RESULTADOS

Interacción nutrición x genoma: crecimiento e índices biométricos

Los resultados derivados de los cruces y del engorde en el IATS para el estudio interacción nutrición x genoma se muestran de manera detallada en el ANEXO-A⁴.

A modo de resumen se indican a continuación los aspectos más relevantes:

- De los 2.545 peces marcados con *PIT-tags*, el 96% (2.441) fueron asignados de forma inequívoca a una pareja de parentales. De los 15 progenitores seleccionados para la obtención de puestas de larvas con diferente potencial de crecimiento, 13 contribuyeron a la descendencia dando lugar a 18 familias, aunque dos de ellas estuvieron constituidas por un sólo individuo y fueron descartadas del estudio. (Fig. 14).

⁴ Artículo enviado a publicar a *Aquaculture* en febrero del 2019

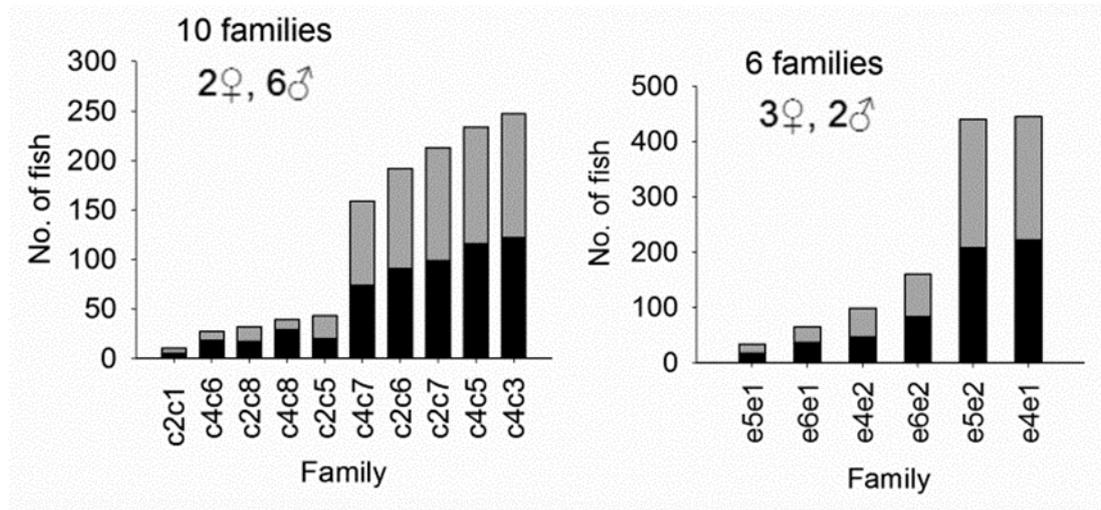


Figura 14. Cruces, composición por familia, y distribución de peces en las dietas experimentales (D1 and D2).

- Los dos grandes grupos de peces estudiados (cxcy, exey) crecieron de igual manera con ambas dietas desde 17 g hasta 214 g de peso medio, con tasas de crecimiento (SGRs) de 0.83-1.8 durante los períodos de crecimiento acelerado y 0.21 durante el invierno. La eficiencia de conversión del alimento (FE) fue de 0.8-1 durante el período de crecimiento acelerado y de 0.55 durante el invierno. Considerando todo el período experimental, la SGR global fue de 0.7 y la FE de 0.56, sin diferencias entre dietas (ver Fig. 15).
- La evolución del peso y el factor de condición a lo largo del período experimental mostró que la selección de los peces por alto crecimiento, pero no la dieta, modificó el patrón de crecimiento (ver anexo A, Fig. 3). A nivel global, las familias exey aumentaron de peso más rápidamente con ambas dietas que los controles durante el primer período inicial de crecimiento acelerado (septiembre 2017-noviembre 2017). Estos peces continuaron creciendo más rápido que el grupo control durante el invierno-primavera (noviembre 2017 a mayo 2018). Como resultado, la mayor diferencia de peso entre las poblaciones cxcy y exey se observó en el muestro de mayo. Sin embargo, con el aumento estival de las temperaturas, la tendencia de las familias cxcy fue aumentar de peso más rápidamente que las exey, por lo que este tipo de crecimiento compensatorio acabó disminuyendo las diferencias de peso de la progenie de los dos grupos de familias al final del engorde.
- Un análisis pormenorizado de las tasas de crecimiento confirma que no hay efecto de la dieta sobre el crecimiento ni sobre el patrón diferencial de crecimiento de las familias seleccionadas o no seleccionadas por alto crecimiento. De hecho, considerando todos los períodos analizados, se obtuvo una alta correlación lineal ($R^2=0,99$) con una pendiente próxima a 1 entre los SGR de las diferentes familias alimentadas con ambas dietas experimentales (Fig. 16). Ello pone de relieve una débil interacción nutrición genoma que también se evidenció con un modelo de interacción lineal que incluye efectos fijos y aleatorios (ver anexo A, Fig.6).

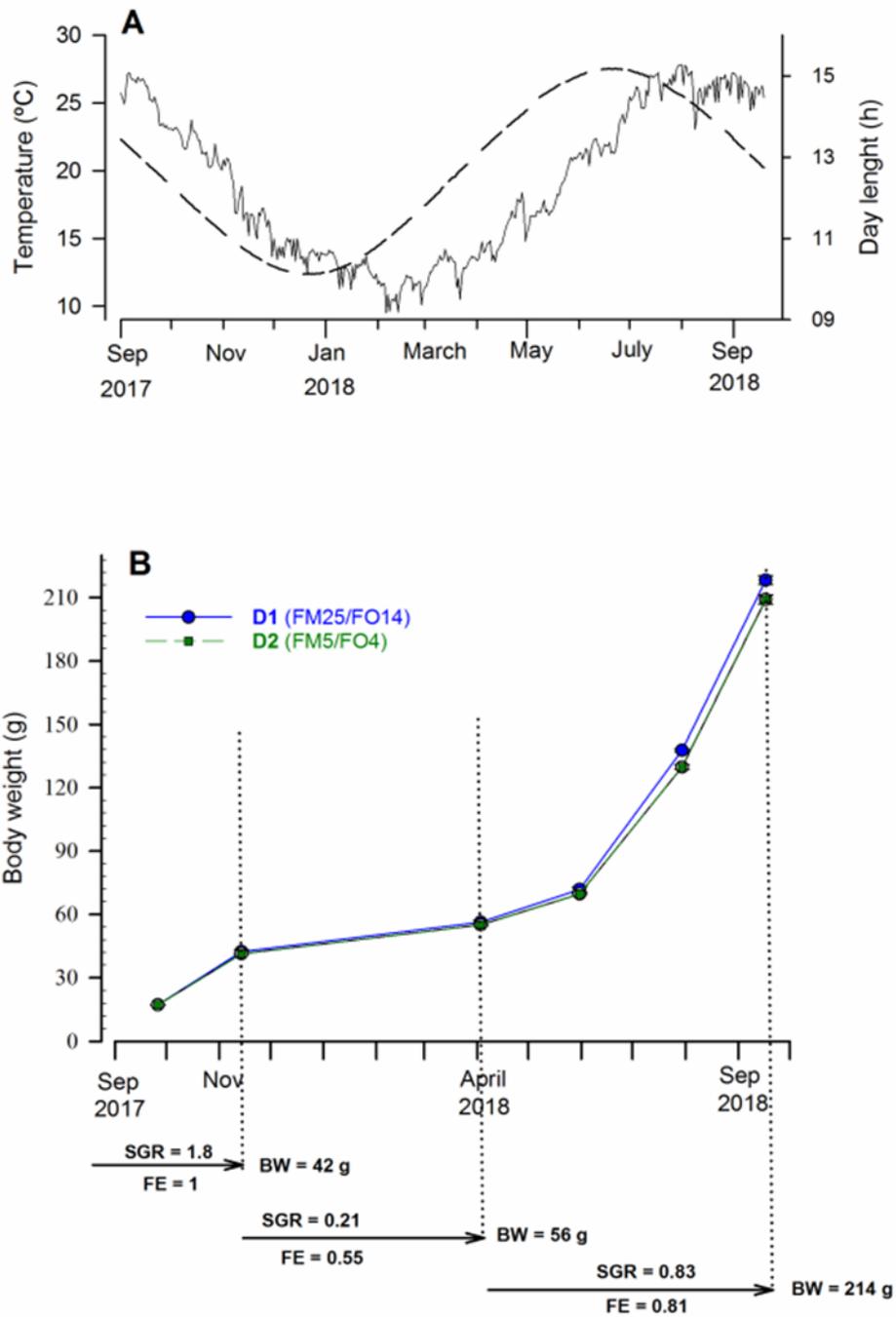


Figura 15. Variaciones estacionales de temperatura y fotoperiodo durante el periodo experimental (A). Peso de las dos poblaciones de peces alimentadas con las dos dietas experimentales a lo largo de todo el engorde (B).

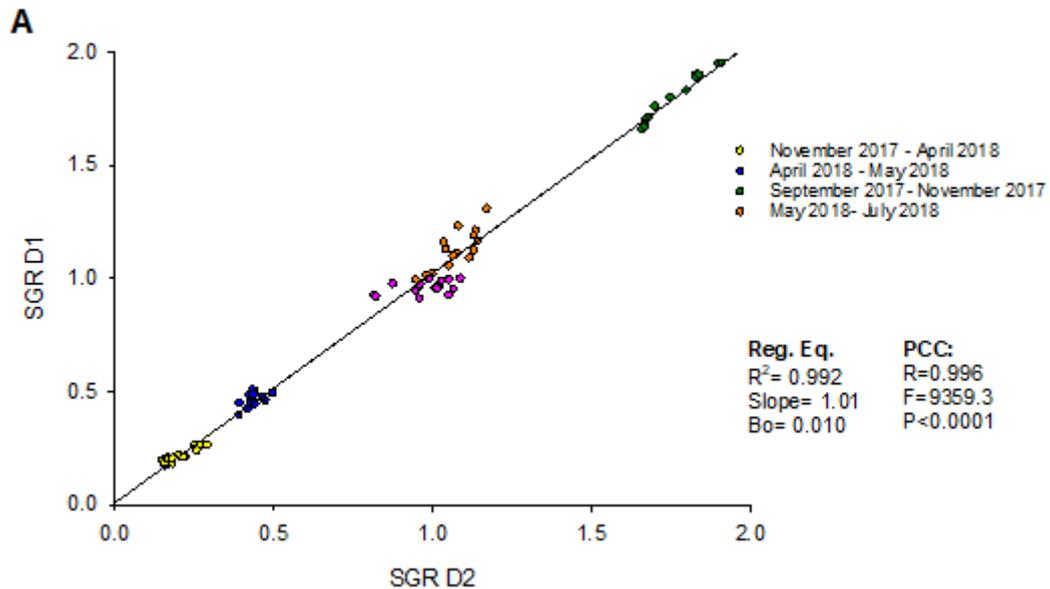


Figura 16. Tasas de crecimiento (SGR) de los peces alimentados con las dietas experimentales D1 y D2 a lo largo de todo el engorde. PCC, *Pearson correlation coefficient*

- En la Tabla 3-anexo A, se muestran los efectos del genotipo y la dieta sobre diferentes índices de las familias seleccionadas como representativas del conjunto de la población. Los resultados muestran que no hay efecto dieta, pero sí del genotipo sobre el peso, la talla y el factor de condición. Por el contrario, hay efecto genotipo y dieta sobre los índices hepatosomático (HSI) y de grasa mesentérica (MSI), pero sin interacción entre ambos factores. La tendencia observada es un menor tamaño del hígado en los peces alimentados con la dieta control, en contraposición a una mayor deposición de grasa en el tejido adiposo perivisceral. Es difícil establecer un patrón global para familias control y elite, aunque es de reseñar que la familia c4c3 mostró el mayor acumulo de grasa mesentérica con independencia de la dieta.
- Las características biométricas del intestino, como los índices de peso (IWI) y longitud (ILI), resultaron afectados significativamente por la dieta ingerida, con valores más altos en los peces que ingirieron la dieta vegetal D2, y sin interacción significativa familia x dieta (Tabla 3-anexo A). Sin embargo, al agrupar las familias por bajo (c2c7, c4c3), medio (e4e1) y alto (e5e2, e6e2) crecimiento, se observó que los peces de mayor crecimiento presentaron intestinos más cortos cuando ingirieron la dieta control (Fig. 8). Al ingerir la dieta D2, estos peces mostraron los mayores incrementos en la longitud de sus intestinos, alcanzado los valores propios de las familias de bajo crecimiento (Fig. 8). Estas observaciones sugieren diferentes respuestas adaptativas para seguir manteniendo una alta capacidad de digestión y absorción de nutrientes en base a la dieta y la genética del pez.

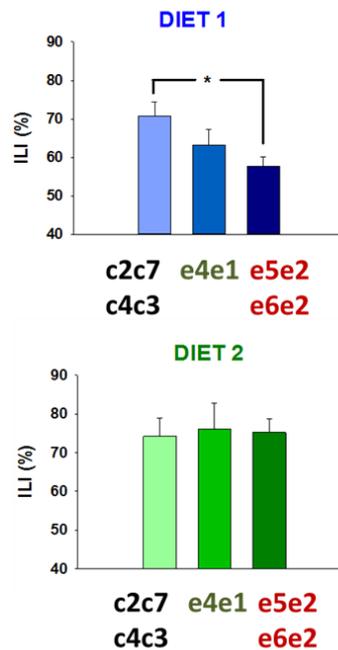


Figura 17. Efecto de las dietas experimentales sobre la longitud relativa del intestino (ILI), calculado como porcentaje de la longitud del pez

Interacción nutrición x genoma: patrones de expresión génica

El ANOVA de dos vías muestra que 26 de los 29 genes del array estuvieron nutricionalmente (efecto dieta) y/o genéticamente (efecto familia) regulados (Tabla 24). El efecto dieta, fue más evidente en marcadores del metabolismo lipídico y energético, mientras que los marcadores de crecimiento (eje GH/IGF) se mostraron especialmente regulados por la dieta, quedando reducida la interacción dieta x familia a unos pocos genes del metabolismo lipídico, concretamente a elongasas (ELOVL6) y desaturasas (FADS2, SCD1a).

Al contrario que con los índices biométricos del intestino, el efecto familia quedó en gran parte enmascarado por la dieta control y no por la dieta de mayor contenido en ingredientes vegetales (D2). Así pues, el ANOVA de una vía detectó un efecto familia ($P < 0.05$) para tan sólo 2 genes (ELOVL6, SCD1b) de los 16 del metabolismo lipídico, o 3 de un total de 29 en peces alimentados con la dieta D1, frente a los 10 de metabolismo lipídico (ELOVL1, 4, 5, 6; FADS2, HL, PLA2G6, PPAR α , PPAR β), 2 de metabolismo energético (CS, SIRT1) y 3 de crecimiento (IGF-I, IGFBP-2a, IGFBP-4) en los peces alimentados con la D2. En total, ello supone cambios estadísticamente significativos en 13 genes, cifra que aumenta a 23 con un nivel de significación del 10% ($P < 0.1$), pero que queda reducida a tan sólo 5 genes (ELOVL6, SCD1b, PPAR β , CS, SIRT1) con la dieta D1.

Es más, un análisis más detallado de los datos de expresión de los peces alimentados con la dieta D2 muestra dos patrones de expresión claramente diferenciados, que se corresponden con las familias cxcy y exey. Ello es más evidente para la comparativa entre c2c7/c4c3 y e4e1/e6e2, ya que la progenie de la familia e5e2 mostró un patrón intermedio. Este hecho es especialmente evidente para algunos marcadores del metabolismo lipídico (elongasas, desaturasas). En todo caso y como rasgo en común, el incremento de la expresión de ELOVL6, FADS2 y SCD1a con la dieta D2 fue mayor con la progenie de las familias e4e1/e5e2/e6e2, lo que se traduce en una

interacción significativa nutrición x genoma. Ello es relevante en el caso de estos enzimas, ya que estudios anteriores en el IATS-CSIC han puesto de relieve que estos genes son los que presentan una mayor sobre-expresión en animales con signos de carencias en ácidos grasos esenciales omega-3. Ello estaría favoreciendo un aumento del nivel de instauración de los ácidos grasos poli-insaturados, al mismo tiempo que podría promover una mayor lipogénesis hepática, siendo la familia e5e2 la que muestra un menor índice hepatosomático y una expresión relativamente baja de desaturasas y elongasas en combinación con una baja expresión de HL, aunque contrariamente esta misma familia también mostró el nivel más alto de expresión de LPL hepática (enzima clave en la captación tisular de ácidos grasos, derivados de los triglicéridos de las lipoproteínas circulantes).

Marcadores del metabolismo de los fosfolípidos y colesterol también mostraron un efecto de la dieta y la familia. Aumentado la expresión de PLA2G6 con la dieta D2, al ser esta fosfolipasa otro de los marcadores de un bajo contenido en aceites de pescado, y por consiguiente de n-3 PUFAs. Por el contrario, la expresión de CYP7A1 fue claramente inhibida por la dieta D2 con independencia de la familia, al ser este enzima uno de los principales responsables del efecto hipo-colesterolémico de las harinas y aceites vegetales.

Factores de transcripción del metabolismo lipídico también se vieron afectados por la dieta, siendo el efecto más claro la acción inhibitoria de la dieta D2 sobre la expresión hepática del PPAR γ en la progenie de las familias c2c7 y c4c3. Dado que el PPAR γ es de conocidos efectos lipogénicos, la correlación inversa entre la expresión del PPAR γ y el índice hepatosomático se debe interpretar como una consecuencia más que una causa de un menor engrasamiento hepático, sin que en ningún caso observaciones histológicas del hígado hayan mostrado signos de esteatosis o cualquier otro tipo de alteración o daño histopatológico.

A nivel global, la expresión de marcadores de actividad mitocondrial disminuyó con la dieta D2, siendo este efecto más evidente a nivel de CS. La misma tendencia, pero menos marcada, mostró la SIRT-2. En cualquier caso, los marcadores de actividad mitocondrial (CS, PGC1 α) y estado de energía (SIRT-2) estuvieron regulados genéticamente, con los niveles de expresión más bajos en la progenie de las familias c2c7/c4c3. Esta menor actividad metabólica estuvo asociado a un menor desacople energético (baja expresión de la UCP1) en los peces alimentados con la dieta D2 con independencia de la familia, lo que posiblemente también es indicativo de un menor riesgo de estrés oxidativo con la disminución del grado de insaturación de los lípidos de la dieta.

A pesar de que la dieta no tuvo efecto sobre el crecimiento, 7 de los 8 marcadores hepáticos del eje GH/IGF mostraron una menor expresión con la dieta D2, que no llegó a traducirse a nivel fenotípico en una merma del crecimiento por la posible acción de diferentes mecanismos compensatorios a nivel local (músculo esquelético). También se observó un efecto estadísticamente significativo del genotipo sobre la expresión de IGF-, IGFBP-1a e IGFBP-4. En menor medida, cambios en la expresión de las dos variantes de receptores de GH (GHR-I y GHR-II) también estuvieron genotípicamente regulados, dando como resulta una aparente inhibición del sistema GH/IGF a nivel hepático en las familias cxcy.

A modo de corolario, el análisis multivariante (PLS-DA) del patrón de expresión hepática indica que las dos primeras componentes explican gran parte de la variabilidad observada (40% del 56% total), separando la primera componente los peces a lo largo del eje X en base a la dieta, mientras que la segunda componente promovería la separación en el eje Y de familias cxcy y exey alimentados con la dieta D2. El análisis VIP (variable importance), para valores mayores de 1 demuestra una mayor contribución de los marcadores de crecimiento sobre la componente 1,

mientras que los genes del metabolismo lipídico están sobre-representados en la acción discriminante de la componente 2 (figura 18). Es decir, el efecto dieta afecta en gran medida al crecimiento, mientras que el efecto familia tiene una mayor incidencia sobre el metabolismo lipídico y los de depósitos grasos.

Tabla 24. Efecto de la dieta y de la familia sobre el patrón de expresión hepático de marcadores del metabolismo lipídico, energético y del eje GH/IGF.

	Diet 1					One-way	Diet 2					One-way	Two-way ANOVA		
	c2c7	c4c3	e4e1	e5e2	e6e2	ANOVA	c2c7	c4c3	e4e1	e5e2	e6e2	ANOVA	DIET	FAMILY	INTER.
Lipid metabolism															
ELOVL1	4.23	3.49	4.24	4.22	4.90	0.27	4.26ab	3.72b	5.89a	4.59ab	5.93a	0.002**	0.018	<0.001	0.315
ELOVL4	0.21	0.16	0.21	0.19	0.21	0.4	0.15ab	0.14b	0.23a	0.19ab	0.21ab	0.019**	0.356	0.015	0.28
ELOVL5	6.89	6.94	7.03	5.73	6.07	0.493	5.64ab	6.00ab	7.36a	3.31a	7.40a	0.024**	0.242	0.016	0.182
ELOVL6	0.50ab	0.58a	0.30b	0.33b	0.59a	0.002**	0.75b	0.77b	1.00ab	0.53b	1.28a	0.001**	<0.001	<0.001	0.006
FADS2	1.08	0.71	0.94	0.34	1.05	0.15	1.41ab	0.71b	3.26a	1.47ab	2.39a	<0.001**	<0.001	<0.001	0.002
SCD1a	0.05	0.04	0.04	0.03	0.13	0.28	0.29ab	0.16b	0.74a	0.20bc	0.55ac	0.015**	<0.001	0.007	0.024
SCD1b	1.18a	1.14a	0.62ab	0.35b	0.73ab	0.007**	1.88	2.02	1.63	0.74	2.23	0.096*	<0.001	0.006	0.465
HL	7.93	7.08	7.83	7.40	8.15	0.821	6.25b	6.72ab	8.79a	6.67ab	9.21a	0.032**	0.76	0.050	0.316
LPL	2.08	2.30	2.73	3.13	2.63	0.314	2.30	2.60	2.96	3.98	2.99	0.097*	0.111	0.007	0.754
ATGL	0.06	0.09	0.12	0.10	0.12	0.79	0.04	0.04	0.05	0.11	0.07	0.356	0.111	0.481	0.752
PLA2G6	0.06	0.07	0.07	0.06	0.08	0.162	0.07ab	0.07b	0.12a	0.08ab	0.11ab	0.004**	<0.001	<0.001	0.200
CYP7A1	0.58	0.61	0.65	0.63	0.54	0.925	0.27	0.30	0.32	0.50	0.31	0.078*	<0.001	0.33	0.678
CPT1A	0.20	0.16	0.17	0.20	0.16	0.7	0.15	0.14	0.20	0.20	0.16	0.364	0.52	0.363	0.642
PPAR α	1.07	1.02	1.34	1.13	1.09	0.303	0.81b	0.87b	1.30a	0.90ab	1.29a	0.001**	0.155	0.002	0.200
PPAR β	0.19	0.27	0.31	0.27	0.26	0.087*	0.12	0.16	0.19	0.21	0.20	0.104	<0.001	0.008	0.697
PPAR γ	0.37	0.34	0.37	0.39	0.39	0.733	0.24b	0.26bc	0.35ac	0.31ab	0.38a	0.002**	<0.001	0.007	0.144
Energy Metabolism															
CS	0.37	0.30	0.40	0.35	0.39	0.058*	0.27b	0.27b	0.35ab	0.30b	0.40a	<0.001**	0.005	<0.001	0.341
PGC1 α	0.10	0.09	0.14	0.13	0.12	0.446	0.11	0.10	0.15	0.12	0.15	0.097*	0.120	0.041	0.764
SIRT1	0.028b	0.029b	0.043a	0.034ab	0.031b	0.003**	0.028ab	0.025b	0.034ab	0.039ab	0.037a	0.026**	0.972	<0.001	0.119
SIRT2	0.111	0.113	0.121	0.109	0.112	0.882	0.092	0.092	0.123	0.101	0.110	0.054*	0.075	0.097	0.541
UCP1	12.16	12.23	12.88	11.66	13.40	0.826	8.13	8.76	9.15	5.84	11.44	0.091*	<0.001	0.066	0.649
GH/IGF axis															
GHR-I	1.19	1.31	1.47	1.40	1.36	0.779	0.94	1.03	1.35	0.98	1.30	0.065*	0.013	0.129	0.726
GHR-II	1.24	1.22	1.32	1.34	1.11	0.514	0.91	0.84	1.10	1.29	1.19	0.051*	0.01	0.088	0.178
IGF-I	8.43	8.11	9.67	9.66	9.16	0.282	3.98b	5.36ab	6.77a	6.11ab	6.45ab	0.028**	<0.001	0.008	0.596
IGF-II	1.74	1.29	1.64	1.60	1.24	0.483	1.40	0.93	1.63	1.42	1.42	0.189	0.316	0.125	0.715
IGFBP-1b	1.12	1.63	1.05	2.08	1.24	0.201	0.29	0.61	0.34	1.07	0.27	0.104	<0.001	0.006	0.989
IGFBP-2a	1.09	1.03	1.07	1.03	1.09	0.987	0.64b	0.68ab	0.86ab	0.72ab	0.96a	0.029**	<0.001	0.251	0.447
IGFBP-2b	1.65	1.70	1.86	1.66	1.75	0.853	1.06	1.16	1.43	1.25	1.43	0.118	<0.001	0.187	0.860
IGFBP-4	0.52	0.49	0.57	0.53	0.57	0.739	0.35b	0.36b	0.54ab	0.45ab	0.58a	0.003**	0.006	0.04	0.293

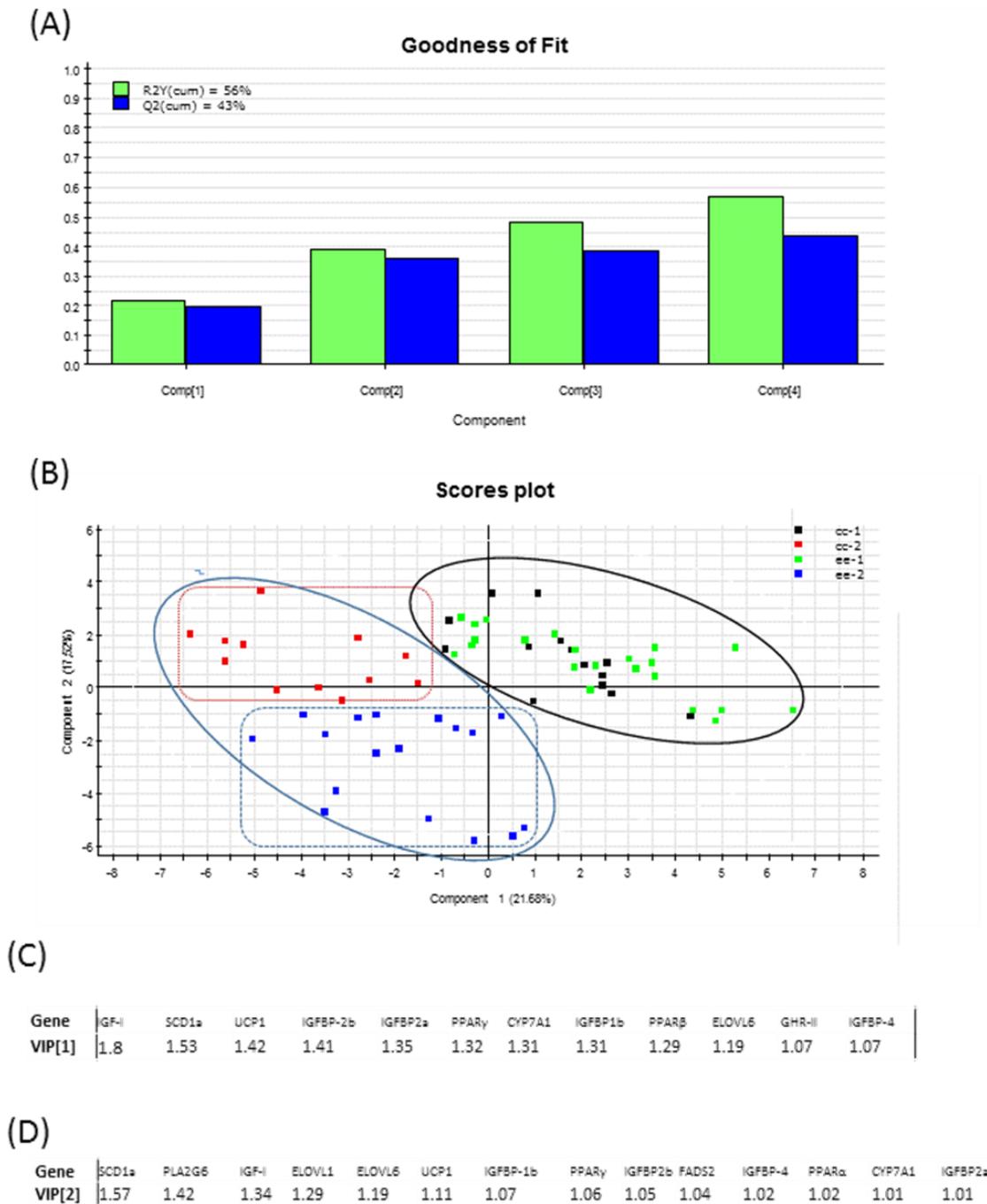


Figura 18. Análisis discriminante del patrón de expresión hepática. (A), varianza explicada (R2Y) y predicha (Q2). (B), *score plot* de las variables coloreadas por dieta y grupo familiar. *Variable importance* (VIP) de las variables (genes) después de la primera (C) y segunda componente (D).

Tests metabólicos

Las tres familias seleccionadas como representativas de la varianza observada mostraron que la selección por crecimiento va ligada a diferentes capacidades metabólicas, que en última instancia comportan una diferente respuesta en animales sometidos a esfuerzo. En los que, en ningún caso, la dieta comportó un efecto significativo y los resultados obtenidos se han considerado de forma conjunta para cada familia. De ello se deduce que la capacidad aeróbica, medida como el máximo consumo de oxígeno en peces sometidos a ejercicio, es muy similar en las tres familias. Sin embargo, la velocidad crítica en los tests de esfuerzo fue significativamente mayor en los peces de las familias de menor crecimiento (c4c3). Esta relación inversa también se puso de relieve al considerar las tasas de crecimiento de cada individuo con independencia de su genética. Por tanto, la selección por crecimiento va en detrimento del metabolismo anaeróbico, lo que parece excluyente de un determinado patrón de crecimiento que favorece un crecimiento más constante o uniforme a lo largo de todo el proceso de producción (figura 19).

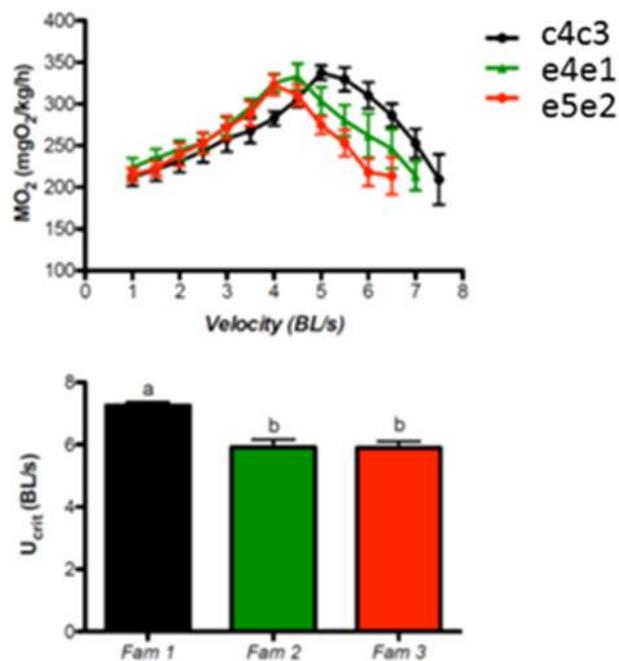


Figura. 19. Consumo de oxígeno (MO_2) y velocidad crítica (U_{crit}) en un test de esfuerzo de familias con diferente tasa de crecimiento.

ACTIVIDAD-A.3

O5. Estudiar la variabilidad genética para la resistencia a patógenos en poblaciones de dorada bajo explotación industrial en el marco de PROGENSA®, incluyendo los patógenos que producen las mayores pérdidas económicas en el sector español (*Vibrio*, *Photobacterium*, *Lymphocystis* y *Enteromyxum*) bajo diferentes condiciones de manejo industrial, y determinar su relación con marcadores del sistema inmunitario para facilitar su selección a escala industrial.

Tarea A.3-1. INFECCIONES EXPERIMENTALES CON *VIBRIO SPP.* Y *PHOTOBACTERIUM DAMSELAE SUBSP. PISCICIDA*

Infecciones experimentales

Participantes: IEO – UPCT – IFAPA - ULPGC

1. CONSTRUCCIÓN SALA DE INFECCIONES EXPERIMENTALES.

Se acondicionó una sala para poder realizar las infecciones experimentales, quedando totalmente aislada del resto de las instalaciones de la Planta de Cultivos.

Habitación de 50 m² con desagüe central y suelo con pendiente al 3% terminado con pintura epoxi antideslizante. Se dotó de aparato de aire acondicionado, para poder regular la temperatura ambiente y la temperatura del agua, luces con programación para controlar el fotoperiodo, entrada de agua de mar y de agua dulce para los tanques y una pila de lavado de material. Los vertidos de la sala están controlados mediante válvulas de bola de PVC en todos los desagües, además de una válvula de seguridad general. Este sistema permite la cloración manual y periódica del agua durante los procesos de infección, también dentro de las tuberías, garantizando así que el vertido final esté libre de patógenos incluso en el caso de fugas accidentales de agua de los tanques instalados en la sala. Se instalaron 5 tanques rectangulares de 200 L de capacidad, provistos de un sistema de recirculación independiente compuesto por filtro mecánico y biológico, dos aireadores, tanque de estabilización y bomba de recirculación sumergible. Cada tanque tiene su sistema de medición de temperatura y salinidad para garantizar la estabilidad de las condiciones a lo largo del tiempo de experimentación. Además se instaló un tanque de infección estanco con aireación para el caso de necesitar realizar infecciones por baño. La sala consta de mesa de muestreo, balanza y lector de chips.

2. REALIZACIÓN DE INFECCIONES.

2.1. Cultivo de Photobacterium damsela subsp. piscicida (Phb) y pruebas de dosificación

El primer año del proyecto, nos centramos en obtener información sobre la resistencia o susceptibilidad de los ejemplares a *Photobacterium damsela subsp. piscicida* (Phb). Los cultivos de la bacteria se realizaron en caldo de triptona de soja (TBS) a 20°C durante 48 horas. El cultivo en fase exponencial, fue lavado tres veces en tampón fosfato salino (PBS) estéril mediante centrifugación a 2700xg durante 15 minutos a 4°C. La densidad óptica de las suspensiones bacterianas fue medida a 540 nm, y el número de unidades formadoras de colonias (u.f.c.)/mL fue calculado usando una curva patrón de crecimiento. La suspensión bacteriana fue ajustada a las concentraciones requeridas para cada experimento en PBS estéril.

Inicialmente se realizaron tres pruebas de dosis con un número pequeño de ejemplares del IEO con el fin de determinar la dosis de bacteria adecuada para obtener un cierto porcentaje de supervivencia en la población. Las doradas utilizadas se cribaron con el fin de tener una población homogénea de 150 peces con peso medio de 3.5 ± 1.0 g para cada prueba. Las dosis probadas inicialmente fueron 0, $4,33 \times 10^7$; $4,33 \times 10^6$; $4,33 \times 10^5$ y $4,33 \times 10^4$ bacterias/pez, administradas mediante inyección intraperitoneal en 100 μ L de PBS estéril. En esta primera prueba se obtuvo un porcentaje de supervivencia cercano al 57% únicamente en la dosis menor, mientras que el resto de las dosis provocaron mortalidades del 100%. En una segunda infección se inyectaron 0, $4,15 \times 10^4$, $4,15 \times 10^3$, $4,15 \times 10^2$ y $4,15 \times 10^1$ bacterias/pez administradas intraperitonealmente en 100 μ L de PBS estéril, obteniéndose un 90% de supervivencia únicamente en la dosis mayor. Una tercera prueba se realizó con el fin de determinar el protocolo de crecimiento de las bacterias previo a su inyección en el pez. Así se determinó que la dosis adecuada para obtener un cierto porcentaje de supervivencia en la población era de 8×10^4 bacterias/pez procedente de un cultivo líquido inoculado directamente con el aislado congelado y sin plaquear. Se estableció una tabla de síntomas y niveles de sufrimiento para la evaluación retrospectiva del proyecto.

2.1.1. *Primera infección experimental con Phb*

A continuación se realizó una primera infección experimental con peces de ELITE de IFAPA/ULPGC y de IEO. Los ejemplares de ambos lotes fueron tranquilizados en 20 μ L/L de aceite de clavo en agua de mar y 400 ejemplares de cada uno fueron seleccionados con un peso medio de $4,08 \pm 0,72$ g. Los 800 ejemplares fueron inyectados con 100 μ L de 8×10^5 bacterias/mL de PBS estéril y se distribuyeron al azar en 4 tanques de infección. Un grupo control compuesto por 30 peces de IEO fue inyectado con PBS estéril y mantenido en la misma instalación con el fin de controlar la correcta manipulación de los ejemplares infectados. Los peces que morían se recogieron dos veces al día durante los 3 primeros días y una vez al día el resto del tiempo de experimentación. Estos ejemplares fueron pesados y congelados a -20°C en bolsas individuales, asignándoles un código numérico en función del día de defunción tras el inicio de la infección. La infección se consideró superada a los 11 días, al ser el número de mortalidades acumuladas en los últimos tres días inferior a 3 en todos los tanques. A los peces supervivientes se les aplicó eutanasia mediante exceso de anestesia (40 μ L/L de aceite de clavo en agua de mar), fueron pesados y posteriormente congelados a -20°C en bolsas individuales asignándoles un código numérico.

2.1.2. *Segunda infección experimental con Phb y extracción de sangre*

Un segundo lote de peces compuesto por 530 ejemplares de ELITE de IFAPA/ULPGC y 460 ejemplares de IEO previamente marcados con un Chip intraperitoneal, tal y como se describió anteriormente, han sido muestreados para la obtención de suero. Los peces fueron sedados con 20 μ L/L de aceite de clavo en agua de mar y se les extrajo 100 μ L de sangre mediante punción de la vena caudal. Esta cantidad se vio que era la cantidad máxima que se podría extraer sin poner en riesgo la vida de los ejemplares y minimizando las pérdidas debido a la manipulación. Aun así, se contabilizó un 23% de mortalidad media en los días posteriores a la extracción, siendo ligeramente superior entre los peces de ELITE de IFAPA/ULPGC. Los ejemplares se han dejado recuperar en condiciones de cultivo con circuito abierto durante 20 días como mínimo. La sangre obtenida ha sido dejada coagular a 4°C durante 16 horas y centrifugada a $10.000 \times g$ durante 10 minutos a 4°C para la obtención del suero que fue congelado a -80°C hasta su posterior análisis.

Un lote de estas doradas a las que se les ha extraído sangre, compuesto por 360 ejemplares de ELITE de IFAPA/ULPGC y 400 de IEO, una vez recuperadas, fueron inoculados con 100 μ L de

8x10⁵ bacterias de Phb/mL de PBS. Un grupo control compuesto por 30 peces de IEO fue inyectado con PBS estéril y mantenido en la misma instalación con el fin de controlar la correcta manipulación de los ejemplares infectados. Los ejemplares que morían se recogieron dos veces al día durante los 3 primeros días y una vez al día el resto del tiempo de experimentación. La infección se consideró superada a los 9 días, al ser el número de mortalidades acumuladas en los últimos tres días inferior a 3 en todos los tanques. A los peces supervivientes se les aplicó eutanasia mediante exceso de anestesia (40 µL/L de aceite de clavo en agua de mar). Todos los ejemplares, tanto susceptibles como supervivientes, de ambas infecciones fueron pesados y una porción de aleta caudal fue guardada en alcohol, asignándoles un código numérico en función del día de defunción tras el inicio de la infección. Estas muestras, se enviaron a la UPCT para su genotipado.

2.1.3. Análisis de la supervivencia tras la infección por Phb

La supervivencia en ambas infecciones estuvo entorno al 60% en todos los tanques excepto en uno de ellos, en donde la tasa de supervivencia descendió de forma significativa (al 43%) (figura 20).

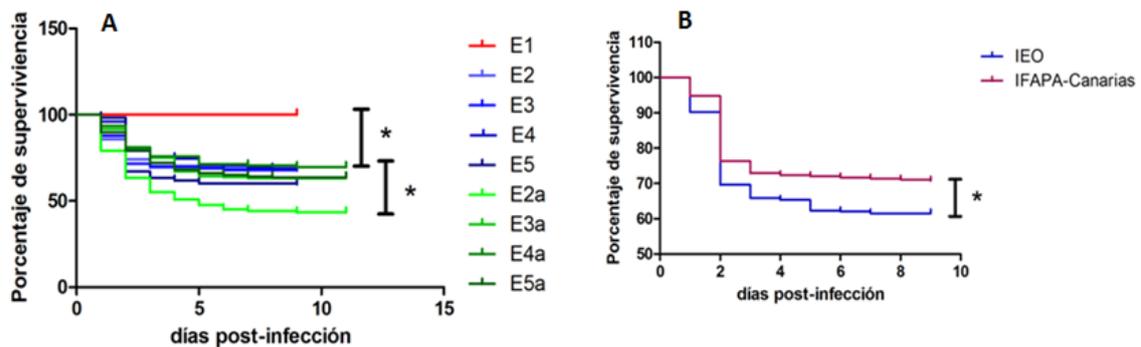


Figura 20. Tasas de supervivencia en peces no infectados (control=E1) e infectados según los distintos tanques de estabulación (A) y según su origen (B), correspondiente a dos experimentos de infección independientes con 8x10⁴ u.f.c de Phb/pez.

El análisis de los pesos determinó que los ejemplares supervivientes eran estadísticamente mayores en peso tanto analizando todos los peces en su conjunto como por orígenes. Al analizar los datos de supervivencia según el origen de los ejemplares, los ejemplares de ELITE de IFAPA/ULPGC muestran una significativamente mayor resistencia a la infección que los de IEO; un 72% frente a un 61%, respectivamente, siendo los peces supervivientes los de mayor peso. Es de destacar que se realizó una homogenización previa de ambas poblaciones de origen, de forma que todos los peces infectados se encontraban dentro del mismo rango de pesos.

2.1.4. Análisis de la sintomatología observada tras la infección con Phb

Los síntomas observados fueron de tres niveles: (1) sin síntomas externos, (2) hemorragias alrededor de la base y a lo largo de las aletas, en el poro genital y en algunos puntos de la piel, (3) aparición de úlceras en las zonas de hemorragias con descamamiento de la piel. En todos los casos los animales murieron antes de las 24 horas tras la observación de los síntomas. No se ha podido encontrar ninguna correlación entre el origen de los peces, el tiempo de resistencia y la intensidad de los síntomas ya que dichos síntomas se observaron en un número muy pequeño de ejemplares (figura 21).

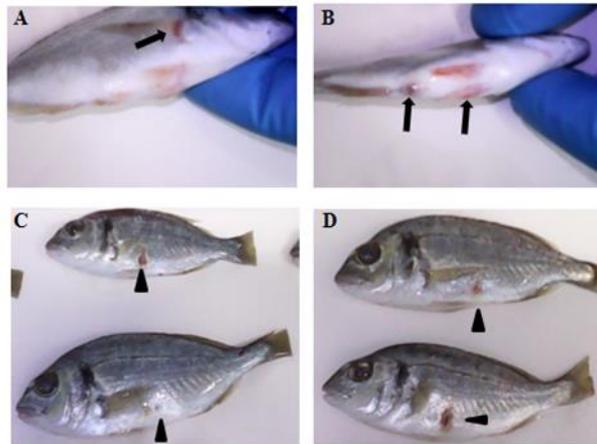


Figura 21. Fotografías representativas de los síntomas observados durante la infección con Phb. La flecha señala zonas de hemorragia (A,B) y la cabeza de flecha señala las úlceras (C,D).

2.2. Infecciones con *Vibrio anguillarum* (Va)

Un lote de peces compuesto por 150 peces del IEO, se infectaron con cinco dosis distintas de Va (1,16x10⁷, x10⁸, x10⁹, x10¹⁰ y x10¹¹ bact/100μL de PBS). Se inyectó 100μL/ejemplar. El tiempo de experimentación duró 12 días y se estableció una tabla con los síntomas observados y los niveles de sufrimiento para la evaluación retrospectiva del proyecto. Se estableció la dosis óptima de infección del orden de 10⁹ bact/pez.

2.2.1. Infección con Va

Un lote de peces compuesto por 139 peces de IEO y 148 de ELITE de IFAPA-ULPGC, se infectó con 1,7x10⁹ bact/100μL de PBS. Se inyectó 100μL/ejemplar. Los ejemplares que morían se recogieron una vez al día durante 18 días hasta que el número de mortalidades acumuladas en los tres últimos días fue inferior a 3 peces por tanque. A los peces supervivientes se les aplicó eutanasia mediante exceso de anestesia (40 μL/L de aceite de clavo en agua de mar). Todos los ejemplares, tanto susceptibles como supervivientes de ambas infecciones, fueron pesados y una porción de aleta caudal fue guardada en alcohol, asignándoles un código numérico en función del día de defunción tras el inicio de la infección. Estas muestras se enviaron a la UPCT para su genotipado.

2.2.2. Análisis de la supervivencia tras la infección por Va

En esta infección se observó un porcentaje pequeño de ejemplares ciegos bilateralmente o con heridas abiertas (nivel 4 de sufrimiento) que se consideró que sufrían en exceso y fueron eutanasiados junto con los ejemplares que presentaron secuelas (exoftalmia unilateral y hemorragias oculares unilaterales) al final del periodo de infección. Tanto los eutanasiados como los que tenían secuelas fueron considerados como susceptibles a la infección e incompatibles con las condiciones de un cultivo masivo. Sin embargo, cuando se realizó un análisis por orígenes se encontró que no existían diferencias significativas en el número de estos

ejemplares entre las dos poblaciones (6% en la población del IEO frente al 7% en la población de ELITE).

La tasa de supervivencia en los diferentes tanques infectados vario entre el 43-60%, aunque no hubo diferencias significativas entre los tanques. Los peces supervivientes presentaron pesos mayores en ambas poblaciones. En cuanto al origen, al igual que la infección por Phb, se observa una mayor supervivencia, estadísticamente significativa, en la población de ELITE que en la del IEO (54% y 48%, respectivamente).

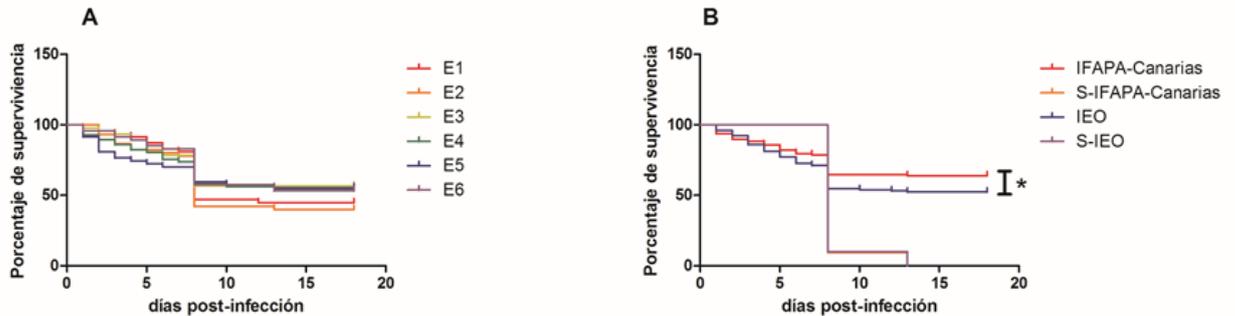


Figura 22. Tasas de supervivencia tras la infección con $1,7 \times 10^9$ u.f.c. de Va/pez en 6 tanques (E1-E6) independientes (A) y tasas de supervivencia y de eutanasia humanitaria (S-) en las dos poblaciones (ELITE e IEO) (B).

2.2.3. Análisis de la sintomatología observada tras la infección con Va

Las mortalidades tras la infección con Va fueron mucho menos rápidas que tras la infección con Phb. Los síntomas encontrados fueron: exoftalmia unilateral y bilateral, zonas necróticas irregulares en la piel que evolucionaron hacia una desintegración de la misma con aparición del músculo necrótico subyacente, ceguera con hemorragias oculares internas y opacidad del cristalino al volverse blanco. Estos síntomas se observaron tanto en ejemplares que perecieron rápidamente como en ejemplares más resistente, incluso en el caso de la ceguera y la exoftalmia en ejemplares supervivientes. Todos estos ejemplares, tanto los eutanasiados por motivos humanitarios según los protocolos de bienestar animal establecidos al efecto, como los supervivientes con síntomas permanentes, fueron considerados como susceptibles de la infección ya que dichos síntomas son incompatibles con una adecuada alimentación y un sistema productivo convencional. Estos síntomas aparecieron en ambas poblaciones estudiadas y su cantidad no presentó diferencias significativas respecto a su origen poblacional.



Figura 23. Fotografías representativas de los síntomas observados durante la infección con Va. La flecha señala exoftalmia (A), la cabeza de flecha negra señala una zona necrótica (B) y la cabeza de flecha blanca un ojo con hemorragia y principio de opacidad del cristalino (C).

Tarea A.3-2. INFECCIONES POR LINFOCISTIS

Participantes: IFAPA – IEO – ULPGC - MARESA

1. Contexto

La dorada (*Sparus aurata*) es una especie de gran importancia económica en la región Suratlántica europea y cuenca mediterránea, siendo la primera especie marina por volumen de producción en Europa, con una estima de 207.000 toneladas en 2017, con Turquía (34,5 %), Grecia (30,1 %), Egipto (8,7 %) y España (7%) como principales productores (APROMAR, 2018).

Las infecciones víricas constituyen un problema creciente para la acuicultura, debido a las pérdidas económicas derivadas del retraso de crecimiento y mortalidades que provocan y el establecimiento de infecciones persistentes y de portadores asintomáticos, que pueden convertirse en reservorios que propagan y diseminan partículas víricas durante largos períodos de tiempo. Todo ello, unido a la escasez de herramientas para su detección y a la falta de tratamientos antivirales, hace que estas enfermedades sean un cuello de botella para el desarrollo de la acuicultura (Walter y Winton, 2010; Borrego et al., 2017).

En la dorada, la enfermedad de linfocistis (LCD) es la patología más frecuente de origen viral descrita en los cultivos de esta especie hasta la fecha (Borrego et al., 2017). El LCDV es el agente causal de la enfermedad de linfocistis y se caracteriza por la aparición de pequeños nódulos de color blanquecino a grisáceo (Fig. 24), que pueden aparecer aislados o, con mayor frecuencia, agrupados en racimos y localizados en la superficie del cuerpo y las aletas, pudiendo llegar a cubrir todo el cuerpo del animal (Wolf, 1988; Anders, 1989). Dichos nódulos están constituidos por células hipertrofiadas denominadas linfocistes o células linfoquísticas.

La LCD es una infección autolimitada que, dependiendo de la especie hospedadora y las condiciones ambientales, puede prolongarse por un tiempo variable. Así, por ejemplo, en doradas mantenidas a 20°C las lesiones suelen remitir totalmente en unos 45 días (González et al., 1996; Kvitt et al., 2008; Cano et al., 2009). En las instalaciones de acuicultura, la LCD suele presentar una elevada morbilidad, ocasionando graves pérdidas económicas relacionadas con una desfiguración de los animales que impide su comercialización. Además, los animales enfermos muestran un descenso del crecimiento y anemia siendo más susceptibles a infecciones bacterianas secundarias, canibalismo y/o infestaciones parasitarias y ocasionalmente muerte por inanición (Deuff y Renault, 1993; Borrego et al., 2017).

La enfermedad ocurre de forma recurrente en las instalaciones dedicadas al cultivo de la dorada en Andalucía. Este hecho, unido a la falta de tratamientos antiviral hace necesario mejorar la resistencia de los animales a estas infecciones víricas, evaluando la resistencia genética de familias de dorada a sufrir la enfermedad de linfocistis dentro del plan de selección genética para la mejora de la producción de dorada PROGENSA (www.progenesa.eu).



Figura 24. Juveniles de dorada infectados por LCDV

2. Diseño experimental y evaluación

2.1 Preparación de familias de dorada y formación lotes centinela

Para la generación de las familias de dorada para evaluación genética, en diciembre de 2017 se establecieron puestas masales a partir de tres lotes de reproductores en el centro IFAPA “El Toruño”, correspondientes a 52 reproductores del grupo control (no seleccionados), 30 reproductores de la Elite F1 y 57 pertenecientes a la Elite F2 (Fig. 25). Para ello, se siguió un modelo 4D que ya había testado previamente en PROGENSA, como adecuado para la maximización del número de familias. Las puestas se recogieron diariamente durante 4 días consecutivos y se cultivaron en incubadores cilindro-cónicos de 1.000 L de capacidad, provistos de circuito abierto de agua de mar y control de temperatura.

Las recogidas se repitieron varias veces, desde febrero hasta junio de 2017 para constituir lotes de evaluación uniformes y constituir lotes centinela de producción. En este período, se enviaron aproximadamente 20 millones de huevos y larvas a las empresas MARESA y CULMASUR en Huelva que construyeron lotes de producción y la formación de grupos centinelas. Los lotes de se cultivaron según condiciones de producción industriales. A la aparición del brote de linfocistis en junio de 2017. Tras detectar los primeros síntomas de la enfermedad producida por *linfocistivirus*, se seleccionaron 2 lotes de peces centinela de distinta edad (Nacidos en febrero y abril) procediendo a la toma de muestras de animales enfermos. Para ello, se seleccionaron dos tanques de peces procedentes de diferentes lotes de puesta y diferente tamaño y se tomaron de cada uno una muestra de 500 peces. De esta forma se selección un lote (abril; lote 1) en fase activa de infección y otro de febrero (lote 2) en fase de recuperación.

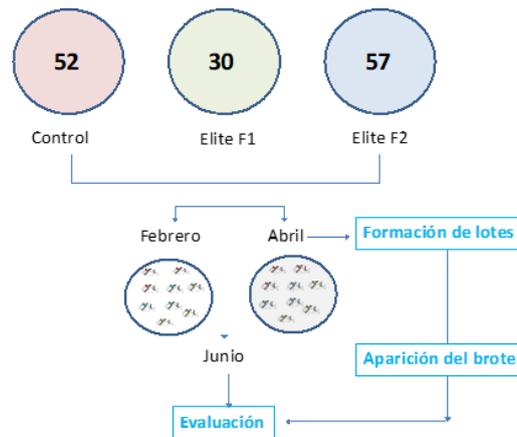


Figura 25. Esquema para producción de familias. Se indica los lotes de reproductores, los lotes formados en febrero y abril y el flujo hasta la evaluación de los animales enfermos.



Figura 26. Evaluación fotográfica de animales infectados por LCDV

2.2 Evaluación fenotípica

Estos animales se sacrificaron en hielo y se transportaron al laboratorio en condiciones de bioseguridad para su evaluación y análisis (500+500 de lote 1 y 2) en las instalaciones del centro “El Toruño”. Los animales muestreados se registraron mediante toma de fotografías individualizadas siguiendo los procedimientos y análisis establecidos en PROGENSA. Para ello, se identificaron individualmente, asignándole un número a cada muestra, se realizó una fotografía a cada animal para realizar la evaluación fenotípica y se congelaron a -20°C para su conservación para posteriormente hacer la determinación biométrica y toma de muestras. Esta forma de proceder es para garantizar las medidas de bioseguridad en la manipulación de muestras por el riesgo de infección en las instalaciones del centro IFAPA El Toruño.

Para el análisis de las lesiones partir de las fotos realizadas se estableció un protocolo y una escala de evaluación (Tabla 25 y Fig. 27) y se realizó en triplicado por personas independientes. La evaluación se hizo independiente en tres regiones de cada pez se dividió (Fig. 27): región 1, desde el opérculo hasta el extremo caudal de la aleta pectoral; región 2, desde el extremo pectoral hasta el principio del pedúnculo y región 3, desde el pedúnculo al final de la aleta caudal. Se establecieron dos parámetros: la superficie afectada y la intensidad de la lesión y ambos criterios se evaluaron con puntuaciones del 1 al 3 (Tabla 25). Para la superficie afectada, se puntuó 1 si se encuentra afectado por lesiones menos del 30% de la región, 2 si está entre 30 y 70%, y 3 si se ve afectado más de un 70% de superficie. Para el criterio de intensidad de la lesión, se asignaron los valores de 1 para lesiones suaves y no abultadas, 2 para lesiones que presentaban un ligero abultamiento y 3 para linfocistes claramente abultados.

Con estos de superficie afectada e intensidad de lesión se determinó un índice mixto de gravedad de la enfermedad denominado el índice de gravedad (IG), correspondiente a la multiplicación de las medias de los valores de las 3 regiones para los criterios de superficie afectada (S) e intensidad de la lesión (L) ($IG = S * L$). Dicho valor oscila entre 1 y 9 y se tipifica como leve, moderado, grave y muy grave según se indica en la tabla 25.

Tabla 25. Clasificación de las lesiones según la superficie afectada, lesión e índice de gravedad. S=Score de la gravedad

Superficie afectada		Intensidad Lesion		Indice gravedad	
S	%	S	tipo	S	Gravedad
1	<30	1	Sin relieve	1-2	leve
2	30-70	2	Leve relieve	2-4	Moderado
3	>70	3	linfocistes	4-8	Grave
				8-9	Muy grave

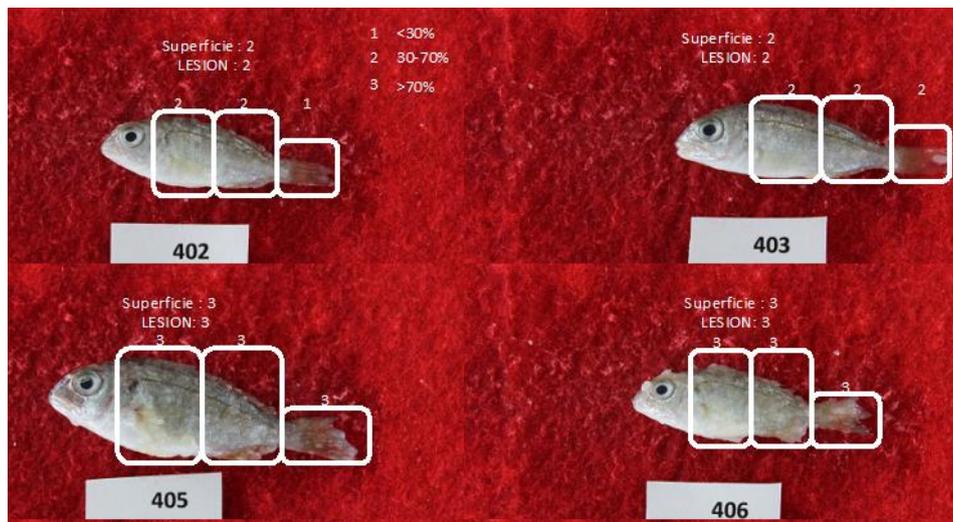


Figura 27. Ejemplo de evaluación fenotípica. Se indican las tres regiones evaluadas en 4 individuos y los criterios establecidos para la superficie, la intensidad de lesión y el IG de cada región.

Por otra parte, se procedió a realizar un análisis morfométrico de cada individuo. Para la medida de la longitud se utilizó el registro fotográfico, tomando la longitud furcal, mediante el software de análisis de imagen (ImageJ). La medida de peso se tomó a partir de los individuos congelados.

2.3 Cuantificación de partículas víricas.

Con el fin de cuantificar el número de partículas víricas de cada individuo, se procedió a la extracción de DNA total a partir de muestras de hígado de cada animal. Aunque LCDV presenta un alto tropismo en aleta caudal y piel y significativamente superior al número de partículas detectadas en hígado (Valverde et al., 2017), se eligió el hígado para los análisis debido a la posibilidad de evitar la contaminación externa, así como por su fácil extracción y tamaño, suficiente para realizar los análisis en animales de pequeños.

Las doradas fueron diseccionadas y se extrajeron asépticamente los hígados, que fueron pesados e inmediatamente homogenizados mediante digestión enzimática con proteínasa K. Para la extracción de DNA total se empleó el método de columna *ISOLATE II Genomic DNA Kit (Bioline)* para los individuos del lote 1. Para las muestras del lote 2, se empleó el método de extracción mediante Fenol-cloroformo usando Trizol (*ThermoFisher*) siguiendo las instrucciones del fabricante. En ambos casos, las muestras fueron tratadas con RNaseL. Las muestras se cuantificaron espectrofotométricamente mediante *NanoDrop 800* y visualización en gel de agarosa.

El número de partículas virales se determinó mediante qPCR absoluta del gen de la proteína principal de la cápside (mcp) siguiendo la metodología descrita por (Valverde et al., 2017)

2.4 Genotipado y asignación de las matrices de parentesco.

Para la asignación de parentesco de las doradas muestreadas y clasificadas fenotípicamente en el apartado anterior se empleó la PCR múltiples de 11 marcadores con su anclaje en el mapa genético de dorada (SMSa1) (Lee-Montero et al., 2013). Este trabajo se hizo coordinado con la ULPGC. La asignación de parentesco se hizo mediante VITASSIGN v8.2.1 (Vandeputte et al., 2006).

Para el cálculo de las estimas para la resistencia a la infección por linfocistis, una vez constituida la matriz de datos, se tuvo en cuenta el modelo $y = X\beta + Zu + e$ donde Y, es el dato para cada caracter, β , es el vector de factores fijos (grupo de reproductores), U, es el vector de efecto animal al azar y E, el error. Se calculó la heredabilidad y correlaciones genéticas y fenotípicas para el peso, longitud, Numero partículas e índice de gravedad. Para el cálculo de la susceptibilidad a la infección se hizo un modelo umbral en el que las categorías del IG leve y moderado se asignaron como poco afectados y las categorías grave y muy grave como muy afectado. Las estimas genéticas en la escala observada se realizó con el programa Wombat (Meyer, 2007) y para el modelo umbral se siguió la corrección propuesta por Dempster y Lerner (1950) para la escala subyacente:

- donde, h^2_{obs} es la heredabilidad en la escala observada (0/1), h^2 es la heredabilidad en la escala subyacente (*logit* o *probit*), p es la proporción de enfermos en la población y z es la altura de la ordenada en la distribución normal que se corresponde con el punto de corte aplicado a la proporción p de enfermedad. La escala observada se usó para estimar las correlaciones genéticas en la escala subyacente ya que entre los caracteres binarios las correlaciones son iguales entre ambas escalas.

Además, se realizó las estimas para la susceptibilidad en el modelo umbral por el método bayesiano GLMM usando el software MCMCglmm (Hadfield, 2010).

3. Resultados

3.1. Datos biométricos de los lotes evaluados

La morbilidad observada en los lotes muestreados fue el 100%. Esto significa que no podíamos evaluar resistencia ya que todos los animales presentaban lesiones por LCDV. No obstante, como los animales presentaban distinto tipo de gravedad en las regiones afectadas, se puede estimar la susceptibilidad genética a padecer la enfermedad LCD.

El lote 1, en fase aguda de la infección, tuvo un peso medio de $1,3 \pm 0,5$ g oscilando en el rango 0,3-2,9 g. El lote 2, en fase de recuperación tras 2 meses de inicio de la infección, tuvo un peso

medio de $3,8 \pm 1,1$ g oscilando entre 1,4-7,0g. Para la longitud, el lote 1 tuvo $3,8 \pm 0,4$ cm y el lote 2, $5,3 \pm 0,4$ cm (Fig. 28)

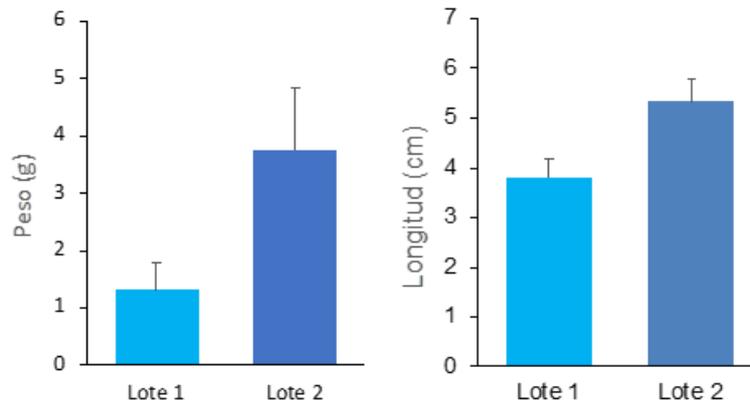


Figura 28. Peso y longitud para los lotes 1 y 2 evaluados. Se indica la media \pm desviación estándar (n=500 para cada lote)

3.2. Datos de evaluación fenotípica

La evaluación fenotípica para cada región se muestra en la Fig. 29. No hubo diferencias significativas en relación a la superficie afectada entre los lotes 1 y 2. La región más afectada fue la Región 1 con un valor medio de $2,7 \pm 0,5$ para lotes 1 y de $2,9 \pm 0,4$ para el lote 2. La región menos afectada fue la R3 con un valor de $2,3 \pm 0,8$ y $1,9 \pm 0,8$ para los lotes 1 y 2, respectivamente. El valor promedio de gravedad por superficie afectada fue de 2,6 y 2.5 para los lotes 1 y 2, respectivamente

Para la intensidad de la lesión, el lote 1 siempre tuvo mayor gravedad. No hubo diferencias entre regiones y osciló entre 1,79-1,93 para el lote 1 (promedio $1,9 \pm 0,7$) y entre 1,4 y 1,6 para el lote 2 (promedio $1,5 \pm 0,6$) (Fig. 29).

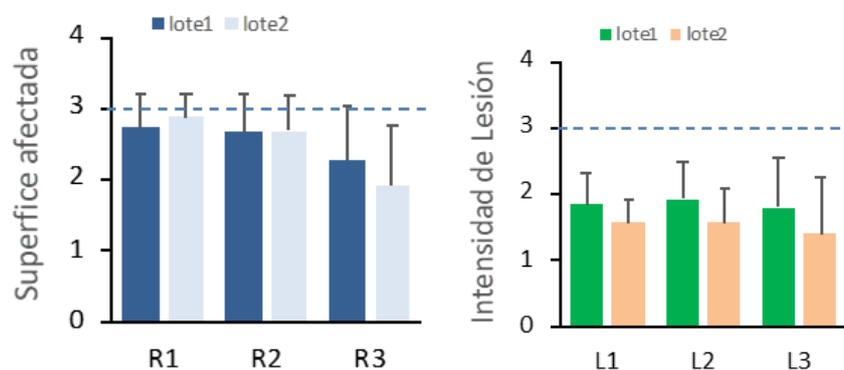


Figura 29. Grado de afectación de lesiones de LCDV por superficie afectada e intensidad de lesión para las regiones 1, 2 y 3.

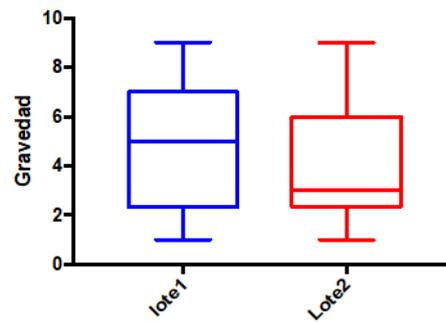


Figura 30. Box-plot del Índice de gravedad. El recuadro contiene el 75% de los datos

El índice de gravedad (IG=S*1) para el lote 1 fue de $5,0 \pm 2,6$ y para el lote 2 de $3,9 \pm 2,2$ (Fig. 30). De acuerdo con el IG se establecieron 4 categorías (de leve a muy grave). En el Lote 1, los animales poco afectados fueron del 40% (leves o moderados). Para el lote 2, este porcentaje fue del 60% (Fig. 31).

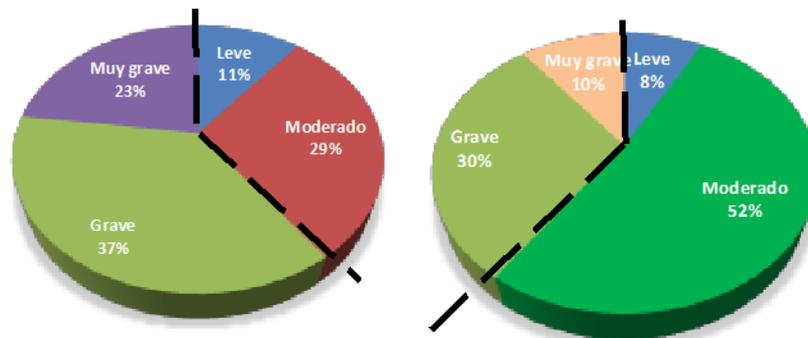


Figura 31. Distribución de categorías para IG en el lote 1 (izq) y lote 2 (dcha). La línea negra indica las categorías poco afectadas (leve y moderada) de las muy afectadas (grave o muy grave) y usadas para el análisis umbral.

3.3. Datos de infección viral.

Además de la evaluación fenotípica, en cada animal se cuantificó la concentración de partículas virales estimadas como copias de ADN por μg de ADN total. El promedio de copias de ADN estimadas en el lote 1 fue de $9,2 \times 10^7 \pm 7,2 \times 10^8$ μg de ADN total⁻¹. En el lote 2 fue de $6,3 \times 10^5 \pm 5,9 \times 10^6$ μg de ADN total⁻¹.

Nuestros datos demostraron una correlación positiva ($r^2=0,90-0,94$) entre la categoría de gravedad y la concentración del número de partículas en el hígado (en logaritmo) tanto para el lote 1 como 2.

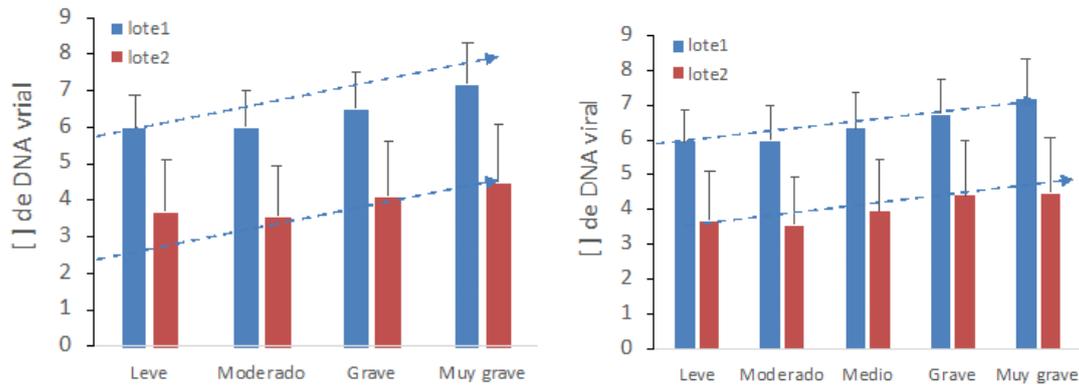


Figura 32. Concentración de ADN vira (logaritmo10) µg ADN total-1 para el lote 1 y 2 considerando 4 o 5 categorías de gravedad en función del IG.

3.3. Contribución de parentales y asignación de parentesco

Los datos de asignación se muestran en la tabla 26. Para el lote 1, de los 499 animales muestreados, se purificó ADN y amplificaron correctamente 464 individuos que asignaron en un 87.3% a un parental y un 76.1% a ambos parentales. En el lote 2, el número de individuos analizados fue de 486 con un total del 88.9% asignados al menos a un parental y 70% asignado a los dos parentales.

Tabla 26. Datos de asignación. Se indica el número total de animales analizados, los % asignados a 1 parental (1P) o 2 parentales (2P)

Total	Lote 1	Lote 2
Total	464	486
1P	445 (95,9%)	454 (93,4%)
2P	399 (86,0%)	408 (84,0%)
Familias	150	128

En la distribución por lotes de reproductores el 87% de la progenie fue del grupo elite F2, un 9,7% de elite F1 y un 3.3% de los controles.

En total contribuyeron 83 reproductores (60% del total) que produjeron un número total de familias de 150 para el lote 1 y de 128 para el lote 2 obtenidas mediante el modelo 4L (Tabla 26). 55 reproductores estuvieron representados en ambos lotes, mientras que 11 sólo estuvieron representados en el lote1 y 17 en el lote2. No obstante, hubo un gran sesgo en la contribución familiar. En el lote 1 se identificaron 47 reproductores y en el lote 2, 46. Cuatro de estos reproductores contribuyeron más de 50 hijos cada uno (Fig. 33).

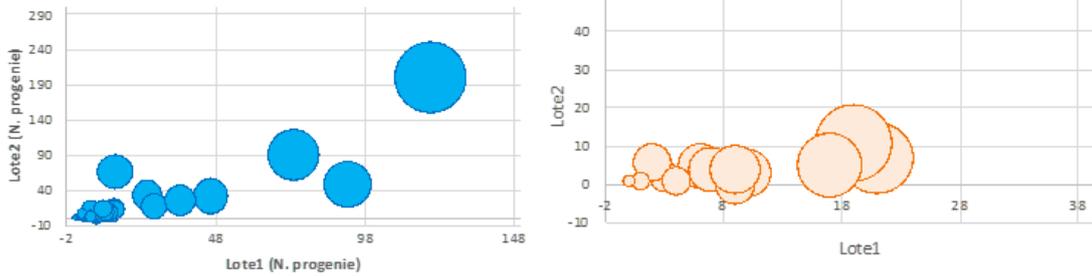


Figura 33. Contribución de progenie de reproductores en el lote 1 y 2 para el grupo de éliteF2 y élite F1

El estudio del número de copias de ADN viral de la descendencia por parental teniendo en cuenta el promedio de su descendencia indicó un amplio rango de variación especialmente en el lote 2 (1,8-6,2) (Fig. 34). Las diferencias entre parentales fueron mucho mayor para el IG tanto para el lote 1 como para el lote 2 (rango 1,7-9) indicando que los padres generaban descendencia con distinto IG y por tanto seleccionable.

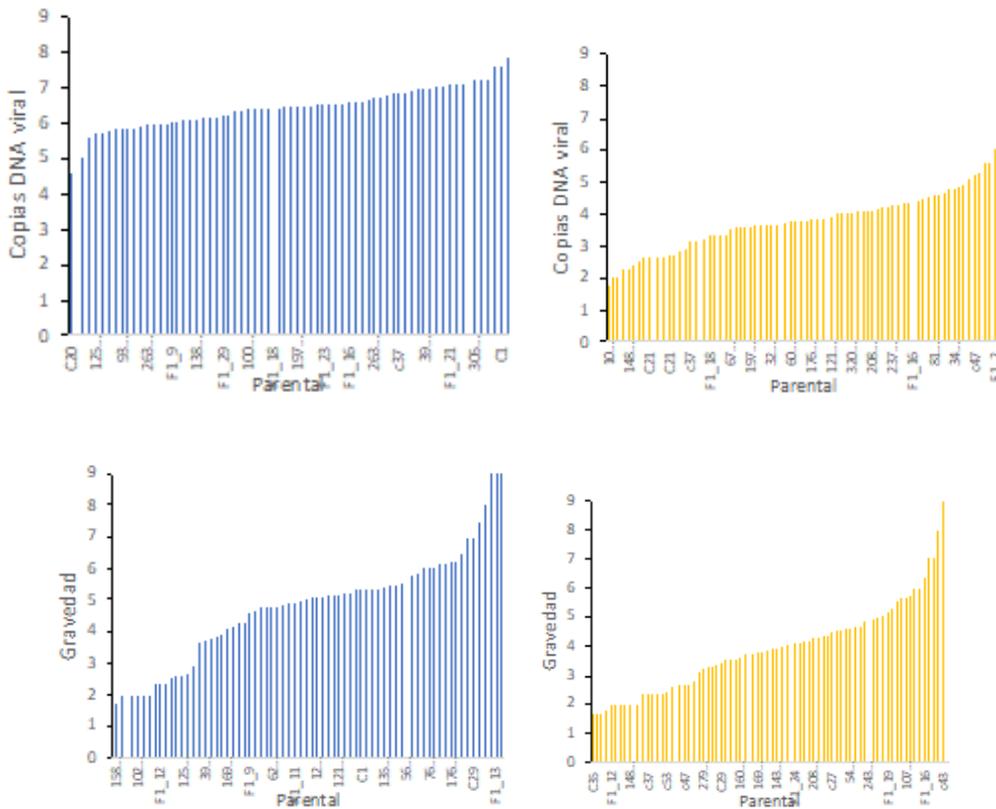


Figura 34. Número medio de copias de ADN viral (log) y gravedad (IG) de la descendencia de cada reproductor del lote 1(izq) y lote 2 (dcha)

3.4. Estimaciones genéticas

Las estimaciones se realizaron por separado para cada lote dado las distintas fases de la infección en la que se encontraban los lotes evaluados. Los datos fenotípicos se muestran en la tabla 27.

Tabla 27. Datos fenotípicos de las estimaciones genéticas.

	Lote1					Lote2				
	n	media	stdev	Min	max.	n	media	stdev	min.	max.
peso	445	1,302	0,477	0,3	2,9	452	3,709	1,065	1,4	9,6
long	445	3,768	0,381	2,5	4,8	452	5,285	0,425	4	7
Parti	442	6,385	1,12	2,1	10,1	442	3,84	1,489	0,4	8,1
IG	445	4,978	2,544	1	9	453	3,965	2,207	1	9
4C	445	2,542	0,959	1	4	454	2,211	0,835	1	4
4Cbin		0,566	0,496	0	1	454	0,357	0,480	0	1

En el lote 1 (Tabla 28), el peso y la longitud presentaron una heredabilidad de 0,18 y 0,16 respectivamente. No hubo heredabilidad para el número de partículas mientras que para el IG en la escala observada fue de 0,18. Usando el modelo umbral, para animales poco afectados (leves o moderados) vs muy afectados (graves o muy graves) la heredabilidad fue de 0,20 en la escala observada, pero al transformarlo a la escala subyacente fue de 0,32. Este dato se confirmó mediante una aproximación bayesiana que proporcionó una heredabilidad de 0,31 para el modelo umbral.

Respecto a las correlaciones genéticas, fue muy alta entre peso y longitud así como el número de partículas y el IG. Es interesante que la gravedad se correlacionaba de forma alta y positiva con el peso y talla indicando que eran los animales más grandes los que más sintomatología y partículas víricas acumulaban.

Tabla 28. Estimaciones genéticas para peso, longitud, número de partículas, índice de gravedad y modelo umbral (bin en la escala observada y bin_liab en la escala subyacente) para el lote 1. Las heredabilidades se indican en naranja y las correlaciones genéticas en el triángulo superior.

	Peso	Longitud	Partic	IG	bin
Peso	0,18±0,10	0,93±0,05	0,40±0,63	0,83±0,25	0,74±0,28
Longitud	0,94±0,01	0,16±0,09	0,34±0,65	0,57±0,37	0,50±0,36
Partic	-0,05±0,05	-0,04±0,05	0,04±0,04	0,99±0,45	0,99±0,35
IG	0,09±0,05	0,05±0,05	0,40±0,04	0,18±0,09	0,99±0,03
bin					0,20±0,1
bin_liabi					0,32

En el lote 2 (Tabla 29), el peso y la longitud tuvieron una heredabilidad baja indicando que en la fase de recuperación del virus, el papel de los genes que regulan el crecimiento está enmascarado por la recuperación de la infección. La heredabilidad para el número de partículas también fue baja mientras que para el IG en la escala observada fue de 0,17. Usando el modelo umbral, para animales poco afectados (leves o moderados) vs muy afectados (graves o muy

graves) la heredabilidad fue de 0,7 en la escala observada, pero al transfórmalo a la escala subyacente fue de 0,22.

Respecto a las correlaciones genéticas, fue alta y positiva entre peso y longitud (0,98) así como el número de partículas y el IG (>0,98). Es interesante que la gravedad se correlacionaba de forma alta y negativa con el peso y talla indicando que eran los animales más grandes los primeros que se recuperaban y menos sintomatología y número de partículas acumulaban en la fase de recuperación de la enfermedad.

Tabla 29. Estimaciones genéticas para peso, longitud, número de partículas, índice de gravedad y modelo umbral (bin) en la escala observada y bin_liab en la escala subyacente) para el lote 2. Las heredabilidades se indican en verde y las correlaciones genéticas en el triángulo superior.

	Peso	Longitud	Partic	IG	bin
Peso	0,15±0,01	0,98±0,04	-1,00±0,40	-0,35±0,39	-0,34±0,44
Longitud	0,91±0,01	0,06±0,08	-0,96±0,58	-1,00	-0,85
Partic	-0,14±0,05	-0,16±0,05	0,08±0,08	1,00±0,33	0,99±0,88
IG	-0,29±0,05	-0,31±0,04	0,22±0,05	0,16±0,09	0,98±0,10
bin					0,17±0,08
bin_liabi					0,22

Tarea A.3-3. INFECCIONES EXPERIMENTALES CON *ENTEROMYXUM LEEI*

Participantes: CSIC – ULPGC - IFAPA

DISEÑO EXPERIMENTAL

Para el experimento del reto parasitario, se trasladaron 252 individuos de tres familias distintas seleccionadas por crecimiento alto (e5e2, n = 84), medio (e4e1, n = 84) y bajo (c4c3, n = 84) a la unidad de patología del IATS. La mitad de los individuos de cada familia (n = 42) habían sido alimentados con D1 y la otra mitad con D2 durante los 7 meses previos al experimento en las instalaciones experimentales de engorde del IATS. Todos los animales se identificaron individualmente con PIT-tags. El traslado a la unidad de patología se realizó 20 días antes del comienzo del reto. En dicho momento, se obtuvieron datos biométricos de las doradas y se distribuyeron en 6 tanques de 500 L de forma que cada tanque contenía 14 individuos de cada familia (7 D1 y 7 D2) con un total de 42 peces por tanque.

Para el reto parasitario, 4 de los 6 tanques experimentales se inocularon por vía anal con el *mixozoo* intestinal *Enteromyxum leei* (receptores, R), y los otros dos tanques restantes se mantuvieron sin infectar (control, C). Los peces R se canularon analmente con un homogenado de raspados intestinales provenientes de peces donantes con una infección alta de *E. leei*, como se ha descrito previamente (Estensoro et al., 2010). La dosis de inóculo se realizó en función del peso individual de cada uno de los peces R, de forma que los peces de 30-50 g recibieron una dosis de 0,2 ml, mientras que los peces de 50-90 g fueron inoculados con una dosis de 0,3 ml. Los peces C recibieron la misma dosis de PBS.

Para comprobar el progreso de la infección se realizó un muestreo no letal a los 35 días post inoculación (dpi). Para ello, los peces se anestesiaron con aceite de clavo, se realizó una biometría y, mediante el uso de un hisopo, se tomó un frotis rectal no letal de los peces R para analizar el progreso de la infección mediante qPCR con primers específicos para el 18S rDNA de

E. leei, según el protocolo descrito previamente (Fox et al., 2000; Sitjà-Bobadilla y Palenzuela, 2012).

El muestreo final se realizó a los 70 dpi, en el que se sacrificaron todos los peces, se realizó la última biometría y se tomaron muestras para diagnóstico histológico ($n = 6$ individuos por familia y por tanque) y molecular mediante qPCR ($n = 8$ individuos por familia y por tanque).

Diagnóstico de la infección

Para el diagnóstico histológico, porciones de intestino anterior (IA), medio (IM) y posterior (IP) se fijaron en formol neutro tamponado 10%, se incluyeron en parafina, se cortaron a un grosor de $4 \mu\text{m}$ y se tiñeron con Giemsa, siguiendo procedimientos histológicos estándar. La intensidad de infección con *E. leei* se evaluó de forma semicuantitativa siguiendo una escala convencional donde 1+ equivale a infección muy baja y 6+ a infección muy alta, según lo descrito previamente (Estensoro et al., 2010). También se identificaron los distintos tipos de estadios del parásito. Se consideró positivo un pez cuando cualquier estadio del parásito se detectó en al menos un segmento del intestino.

Para el diagnóstico molecular se evaluaron las copias de 18S rDNA de *E. leei* mediante qPCR como se ha descrito previamente (Piazzon et al., 2017). Tras la necropsia, los intestinos enteros se extrajeron de la cavidad abdominal, se pesaron individualmente y se homogeneizaron en un Bullet Blender (Next Advance, NY, EEUU). Se extrajo el DNA de una alícuota de $200 \mu\text{l}$ de cada homogenado utilizando un sistema automatizado (EpMotion 5075, Eppendorf, Hamburgo, Alemania) y un kit basado en sílice (Macherey-Nagel, Düren, Alemania). El número de copias del gen se calcularon extrapolando los valores de Ct de cada muestra frente a un estándar construido con números conocidos de copias de plásmido del 18S rDNA de *E. leei* (con un rango de 6-7 órdenes de magnitud) corrido en la misma placa de qPCR. Para cada muestra se incluyeron y evaluaron dos diluciones de DNA. Las muestras con valores de Ct < 38 se consideraron positivas. El número total de genes de rDNA del parásito presentes en cada pez se estimó teniendo en cuenta la cantidad de tejido en el homogenado inicial de cada muestra. Para simplificar, los valores obtenidos se utilizan como una aproximación al número de células de parásito, es decir, se asume una cantidad constante de copias de rDNA por parásito.

Análisis de datos

Las variables parasitológicas cuantitativas estudiadas fueron: Prevalencia de infección (porcentaje de peces infectados por grupo muestreado), Intensidad media de infección (media del número de parásitos por pez infectado) y Abundancia media de parásito (media del número de parásitos por pez por grupo muestreado, es decir, incluyendo los valores negativos de peces no infectados). Ya que en experimentos previos hemos observado que la carga parasitaria de *E. leei* individual en cada pez infectado se encuentra sobredispersada y agregada, la carga cuantitativa de parásito estimada mediante qPCR se normalizó por transformación logarítmica ($y = \text{Ln}(y)$ para los datos de intensidad, e $y = \text{Ln}(1 + y)$ para los datos de abundancia). Las diferencias entre grupos para los datos biométricos y parasitológicos se analizaron usando Prism (GraphPad, CA, EEUU) y Sigma Plot (Systat, CA, EEUU). Las diferencias se consideraron estadísticamente significativas cuando $p < 0,05$.

RESULTADOS

Crecimiento

Todas las familias retadas con el parásito mostraron la típica disminución del crecimiento debida a la enfermedad. El peso final de todos los peces R fue significativamente más bajo que el de su respectivo grupo C de cada familia. Sin embargo, la disminución de peso difirió entre familias (Fig. 35). Los peces C de la familia e4e1 mostraron el mayor incremento de peso, estando los R de la familia c4c3 en el otro extremo (FIG35).

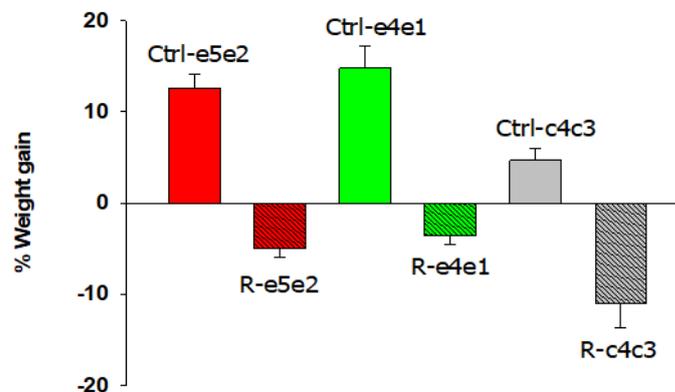


Figura 35. Diferencia de peso en porcentaje al final del experimento de infección con *E. leei*

Mortalidad

A lo largo del reto, se detectaron mortalidades puntuales, con un total de 19 individuos muertos en todo el experimento. De todos los peces muertos, se tomaron muestras intestinales que se analizaron microscópicamente en fresco y en todas ellas se detectó presencia del parásito. La mortalidad acumulada mayor se detectó en la familia c4c3 (17%). Las familias e5e2 y e4e1 mostraron mortalidades del 2% y 0%, respectivamente.

*Datos parasitológicos cuantitativos: diagnóstico molecular**

En el muestreo intermedio (35 dpi) la prevalencia de infección ya fue muy alta en todas las familias, siendo de un 86%, 78% y 90% para las familias e4e1, e5e2 y c4c3, respectivamente. En el muestreo final, las prevalencias de infección fueron similares e igualmente altas (90%, 78% y 87% para las familias e4e1, e5e2 y c4c3, respectivamente). No se encontraron diferencias estadísticamente significativas en los datos de prevalencia. Respecto a la intensidad de infección, la familia e5e2 presenta una intensidad media significativamente menor respecto a las otras dos familias (ANOVA, $p < 0,001$) (Fig. 36). No se detectaron diferencias significativas entre variables (dieta previa) o replicados (tanques) dentro de cada grupo. Ningún animal del grupo C fue positivo para el parásito.

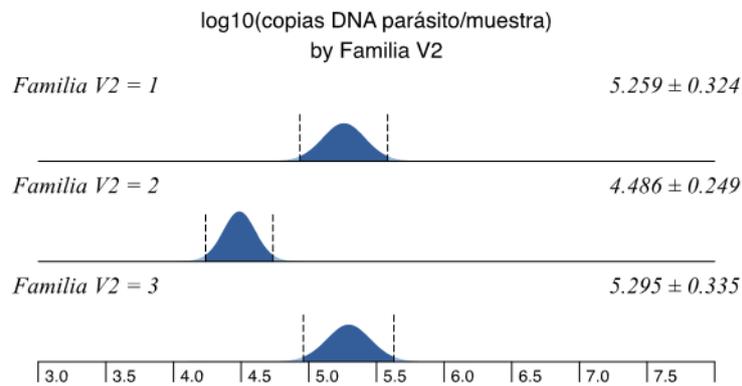


Figura 36. Intensidad de infección por *E. leei* estimada mediante qPCR para las familias e4e1 (arriba, familia 1), e5e2 (medio, familia 2) y c4c3 (abajo, familia 3). Las distribuciones de intensidad están representadas como log₁₀ de copias de DNA de parásito por muestra (\pm SD).

Datos histopatológicos

El examen microscópico de los tres segmentos intestinales de los peces muestreados mostró valores de prevalencia e intensidad de infección muy altos en todos los grupos experimentales (R). Ningún animal del grupo C mostró presencia del parásito. No se encontraron diferencias significativas en prevalencia de infección entre familias (Tabla 30). La prevalencia de infección fue siempre mayor en el intestino posterior, correspondiendo con el patrón de distribución espacial típico de *E. leei* en la dorada. La intensidad de infección por tramo intestinal muestra valores similares a los de la prevalencia, no apareciendo diferencias aparentes entre grupos experimentales. No se encontraron diferencias significativas entre variables (dieta previa) o replicados (tanques).

Tabla 30. Niveles de infección por *E. leei* en doradas según diagnóstico histológico en el muestreo final en cada una de las familias experimentales.

Familia	Prevalencia de infección (%)				Intensidad de infección media		
	total	IP	IM	IA	IP	IM	IA
e4e1	95,8	87,5	45,8	62,5	4,1	3,7	3,4
e5e2	100,0	100,0	62,5	91,7	5,1	3,2	3,7
c4c3	89,5	89,5	42,1	52,6	4,9	3,6	3,4

Tabla 31. Niveles de infección por *E. leei* en doradas según diagnóstico global (histo+qPCR) en el muestreo final en cada una de las familias experimentales.

Familia	n	Prevalencia de infección global (%)
e4e1 (F1)	56	92.86
e5e2 (F2)	56	87.50
c4c3 (F3)	51	88.24

Tarea A.3-4. ANÁLISIS DE LA RESPUESTA INMUNITARIA HUMORAL INNATA Y ADQUIRIDA

Participantes: IEO - UPCT

La sangre obtenida ha sido dejada coagular a 4°C durante 16 horas y centrifugada a 10.000 xg durante 10 minutos a 4°C para la obtención del suero que fue congelado a -80°C hasta su posterior análisis. En estos sueros se estudiará la actividad bactericida frente a diferentes especies bacterianas, entre ellas Phb, y se intentará correlacionar estadísticamente con la susceptibilidad o resistencia a la enfermedad de cada individuo y con la resistencia en días tras la infección y el peso. Se identificarán diferentes familias génicas con diferentes grados de resistencia siempre que sea posible. No se prevé realizar muchas más actividades séricas debido al escaso volumen de suero obtenido. Sin embargo, en los casos en los que los resultados de actividad bactericida y supervivencia determinen un especial interés, y siempre que la disponibilidad de suero lo permita, se podrán realizar otras actividades incluidas en la memoria.

Un lote de estas doradas a las que se les ha extraído sangre, compuesto por 360 ejemplares de descendientes de reproductores de ELITE de IFAPA/ULPGC y 400 de IEO- han sido inoculados con 100 µl de 8×10^5 bacterias de Phb/ml de PBS y la infección se está monitorizando, esperando tener datos de la misma a mediados de noviembre. Tanto los ejemplares susceptibles como supervivientes serán conservados como anteriormente se ha descrito para su posterior genotipado.

En las muestras de suero obtenidas antes de las infecciones, se analizaron dos actividades de la respuesta humoral innata (peroxidasa y antibactericida) y los niveles de anticuerpos (niveles totales de IgM). No se pudieron analizar más parámetros debido al poco suero que se pudo obtener de ejemplares tan pequeños. Ninguno de los tres parámetros analizados mostró variaciones significativas en función de la resistencia a la infección de los ejemplares, ni se correlacionaron estadísticamente con el peso de los mismos. Sin embargo, mientras que los niveles de actividad bactericida en peces de ELITE y de IEO eran semejantes ($19,4 \pm 1,4$ y $17,6 \pm 1,3$ %, respectivamente), los niveles de la actividad peroxidasa eran significativamente superiores y los niveles de IgM total inferiores en los ejemplares de ELITE respecto a los ejemplares del IEO. Los aumentos de la actividad peroxidasa (ELITE: $80,5 \pm 43,0$ e IEO: $27,3 \pm 10,9$ U.I./mL) pueden explicarse por un aumento del metabolismo aeróbico de los ejemplares de crecimiento acelerado, como se ha puesto de manifiesto en los resultados de la actividad A.2. de este proyecto. La diferencia en la cantidad total de IgM (ELITE: $0,19 \pm 0,09$ e IEO: $0,22 \pm 0,05$ O.D. 450nm) sí podría repercutir directamente en la capacidad de la respuesta inmune, siendo los ejemplares del IEO (niveles de IgM mayores) posiblemente capaces de responder (en una respuesta primaria) frente a una mayor cantidad de antígenos o desarrollar respuesta específicas iniciales más intensas. Saber si esto repercute en una mayor capacidad de generar memoria inmunológica o respuestas secundarias más eficaces sería muy interesante de evaluar, pero es algo que no se planteaba en el marco de este proyecto.

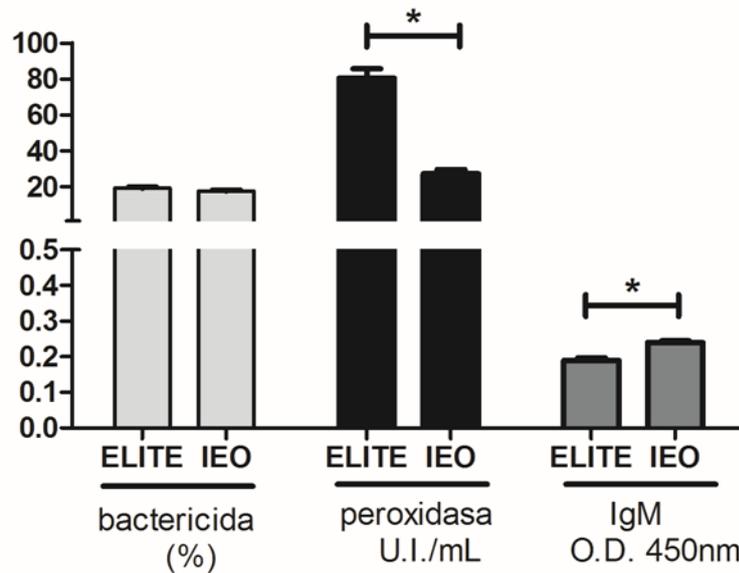


Figura 37. Valores de la actividad bactericida, peroxidasa y niveles de IgM en la población de elevado crecimiento de IFAPA-ULPGC (ELITE) y la del IEO. El asterisco determina la diferencia significativa entre ambas poblaciones según una *t-student* ($P \leq 0,05$).

Tarea A.3-5. ANÁLISIS DE PATERNIDAD

Participantes: UPCT - IEO

Las muestras remitidas por el IEO provenientes de los retos bacterianos fueron analizadas por la UPCT para su genotipo, mediante procesos de extracción de ADN, normalización de concentraciones, amplificación de los once marcadores microsatélites de la SMsa1 (Lee-Montero et al. 2013) y carrera en secuenciador automático.

ACTIVIDAD-A.4

O6. Desarrollar nuevas Tecnologías Facilitadoras Clave (KET's), para la automatización industrial de la valoración de caracteres, mediante el establecimiento y optimización de una base de datos y de análisis de imagen de los peces.

Tarea A.4-1. BASE DE DATOS

Participantes: IFAPA-ULPGC-UMA

En esta tarea se ha adelantado la parte correspondiente a los socios del IFAPA y ULPGC, habiéndose así diseñado la estructura de la Base de Datos, en términos de caracteres a considerar (crecimiento, rendimiento, calidad del pez y de la carne, genotipado, trazabilidad, etc..) bajo condiciones prácticas de cultivo.

El presupuesto fue asignado al IFAPA, quien llevó a cabo una subcontratación que ganó la UNIVERSIDAD DE MÁLAGA.

INFORME SOBRE EL CONTRATO 8.06/5.72.4956 CON EL IFAPA El Toruño EN EL MARCO DEL PROYECTO PROGNSA-III PARA REALIZAR UNA BASE DE DATOS PARA ESTRUCTURAR,

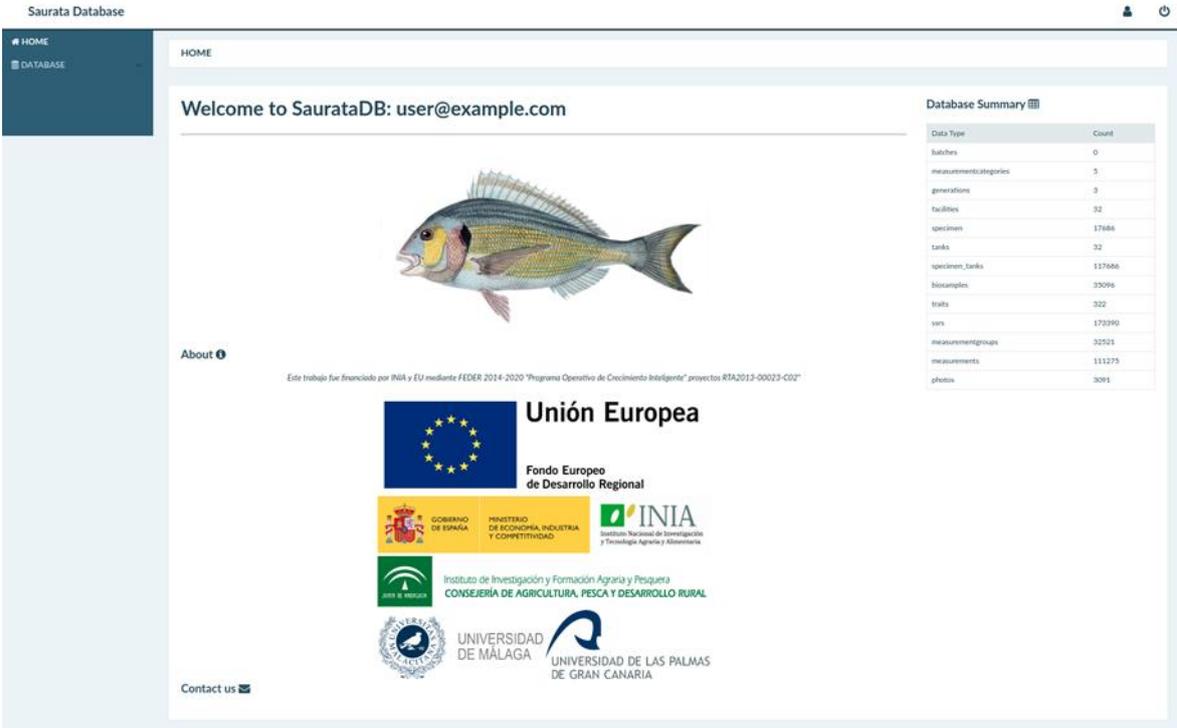
NORMALIZAR Y RECOPIRAR LA INFORMACIÓN DE LOS PARÁMETROS PRODUCIDOS Y DE LAS GENERACIONES DE PROGENSA.

Resumen

Se ha montado un portal web donde se puede consultar la base de datos. La base de datos desarrollada es relacional por ser la más adecuada para almacenar los datos propios de los especímenes y sus medidas, además de la información relativa a los usuarios. Adicionalmente se ha elaborado un programa en Ruby para poblar de manera masiva la base de datos gracias que es capaz de interpretar e importar los datos a partir de una hoja de cálculo cuyo formato estándar ya hemos definido previamente. Con el objeto de facilitar la interacción con la base de datos, se ha construido un sitio web que permite a los usuarios visualizar, filtrar o editar la información importada previamente. Además desde la página web generada se permite añadir información a los especímenes previamente guardados en su correspondiente tabla, como nuevos grupos de medidas, fotos, medidas, muestras biológicas, etc. Finalmente, se está implementando el análisis estadístico automatizado con Wombat a partir de los datos filtrados.

1. Marco de trabajo (*framework*)

Para la gestión y desarrollo de este proyecto, desde de la base de datos hasta del sitio web con una integración transparente e inmediata, se ha recurrido a Ruby on Rails (versión 5.2) porque proporciona las herramientas necesarias para implementar e integrar ambos recursos. Además, la comunidad científica colabora activamente en él, con lo que cualquier necesidad que surja es muy probable que ya haya sido resuelta antes por alguien, con lo que bastará incluir dichas librerías para abordar las características específicas que se necesiten. En la figura 38 se ilustra la página de entrada a la web que da acceso a la base de datos.



Data Type	Count
batches	0
measurementcategories	5
generations	3
facilities	32
specimens	17684
tanks	32
specimen_tanks	117066
biosamples	35096
traits	322
sexs	170390
measurementgroups	32521
measurements	111275
photos	3091

Figura 38. portada de la web de acceso a *SaurataDB*.

2. Base de datos

La base de datos relacional se ha programado con el sistema de gestión de dominio público SQLite v3. Para su puesta en producción, se ha optado el sistema de gestión PostgreSQL, también de dominio público, que es compatible con *SQLite*, pero que ofrece mejor rendimiento. El elemento aglutinador de las tablas es *Specimen*, como puede observarse en el esquema detallado de la figura 39.

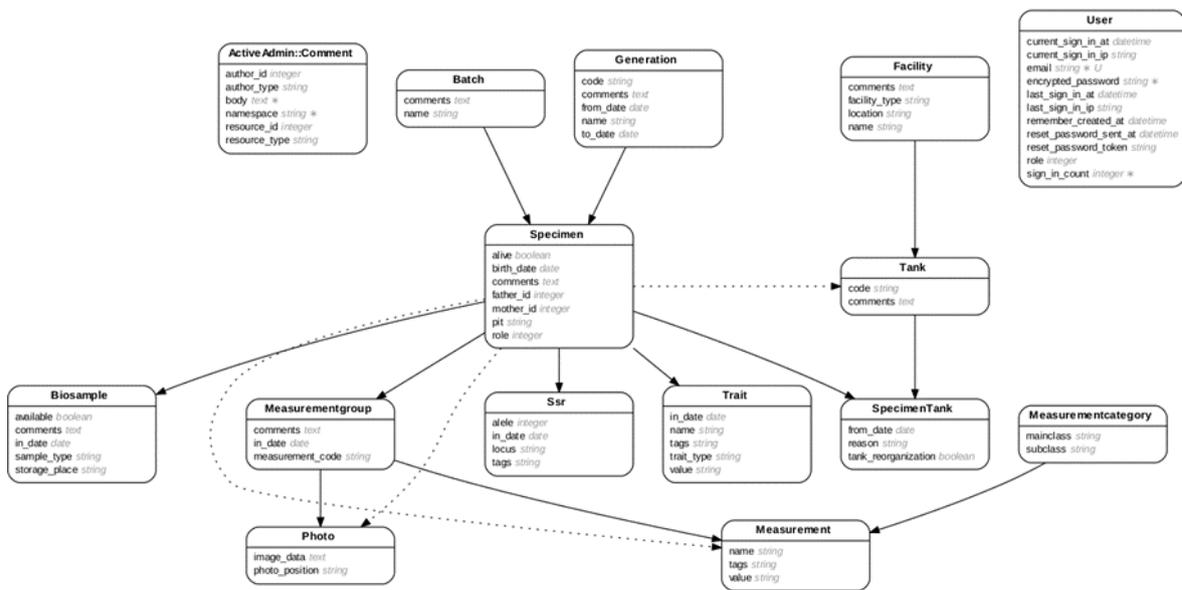


Figura 39. Tablas de la base de datos relacional, con todos los campos definidos en ellas. Las flechas representan la relación establecida entre cada tabla.

La tabla *Specimen* incluye toda la información indispensable para identificar a cada pez, como la fecha de nacimiento, los identificadores de los progenitores, la generación a la que pertenece, etc. Los especímenes se organizan en generaciones y lotes, representados en la base de datos con sus propias tablas, *Generation* y *Batch* respectivamente, con la información necesaria para identificar el origen de los especímenes. A su vez a cada espécimen le pertenecen una serie de grupos de medidas (*Measurementgroup*), muestras biológicas (*Biosample*), microsátélites (*Ssr*), y rasgos (*Trait*).

En cada grupo de medida relacionado con cada espécimen se aglutinan las distintas medidas que se le hayan realizado en un determinado momento. Esto incluye también las fotos tomadas y las medidas realizadas sobre las mismas. Las medidas obtenidas pertenecen, en función de su naturaleza, a una categoría de medida que puede incluir subcategorías, un diseño que permitirá clasificar las medidas dentro de su grupo de medidas. Adicionalmente, a cada espécimen le corresponden una serie de movimientos de tanque (*SpecimenTank*) que pertenecen a su vez a un determinado tanque (*Tank*) localizado en una instalación (*Facility*) concreta, de modo que es posible seguir el recorrido realizado por cada pez. Toda esta información se podrá consultar convenientemente a través de la web.

3. Sistema de usuarios

Para mantener la integridad y privacidad de los datos a la vez que se consultan a través de la web, se ha establecido un control de acceso al sitio web, al que solo accederán los usuarios que estén debidamente acreditados, como se muestra en al figura 40. Esto se ha podido llevar a cabo gracias a las gemas *ActiveAdmin* y *Devise*.

SaurataDB

Login

Email*

Password*

Remember me

Login

Contact us

Este trabajo fue financiado por INIA y EU mediante FEDER 2014-2020 "Programa Operativo de Crecimiento Inteligente" proyectos RTA2013-00023-C02

Unión Europea
Fondo Europeo de Desarrollo Regional

GOBIERNO DE ESPAÑA
MINISTERIO DE ECONOMÍA, INDUSTRIA Y COMPETITIVIDAD
INIA
Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria

CONSEJERÍA DE AGRICULTURA, PESCA Y DESARROLLO RURAL

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA
UNIVERSIDAD DE LAS PALMAS DE GRAN CANARIA

Figura 40. control de acceso a *SaurataDB*

Por las mismas motivaciones, y especialmente para mantener la integridad de los datos, se ha implantado una jerarquía de usuarios, en el que todos tendrán la posibilidad de consultar buscar y descargar datos (usuarios), solo alguno será editor para visualizar y modificar manualmente datos ya incluidos en el sitio web, pero tienen restringida la creación o modificación de usuarios. Como mucho, habrá un editor por grupo de investigación autorizado a consultar la base de datos. Finalmente, el administrador, que será siempre de nuestro grupo de investigación puesto que tiene que ser el desarrollador de la base de datos, tendrá acceso a todos los recursos disponibles en el sitio web, como son visualizar y editar los datos, o gestionar los usuarios de la

propia web. Para este cometido se ha introducido la gema Pundit, que permite gestionar los permisos de cada recurso de una forma óptima.

4. Navegación

Cuando entramos en la base de datos, podemos empezar a navegar por *Specimens* o por *Measurements*. Si empezamos por el primero (figura 41), se muestra una tabla que presenta la información más relevante contenida en la tabla *Specimen*. Asociada a esta, se muestra una barra lateral desplegable que incluye los filtros aplicables sobre la tabla (figura 42), estos están vinculados directamente con la información presentada o con información contenida en las tablas relacionadas. Además, la tabla contiene, enlaces tanto a la página dedicada exclusivamente a cada espécimen (Figura 41), como a las páginas dedicadas a los progenitores. Finalmente, este recurso permite exportar, en formato CSV, todos los datos asociados a una determinada selección de especímenes.

Saurata Database

HOME DATABASE

Specimens Measurements Data Management

Specimens table

Specimens table i

COUNT Pit TAG list

17686

Information after applying filters.

Summary

Pit TAG	Generation name	Generation code	Birth Date	Father pit	Mother pit	Alive	Role	Last Tank	Has measurement?	Has photo?
000687508D	PROGENSA2	F2	April 12, 2010			<input type="checkbox"/>	normal	TAGGING @ Andalucía	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
000687A700	PROGENSA2	F2	April 12, 2010			<input type="checkbox"/>	normal	TAGGING @ Andalucía	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
000687B0A8	PROGENSA2	F2	April 12, 2010			<input type="checkbox"/>	normal	TAGGING @ Andalucía	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
000687C213	PROGENSA2	F2	April 12, 2010			<input type="checkbox"/>	normal	TAGGING @ Andalucía	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
0006894541	PROGENSA2	F2	April 12, 2010	936000002166745	936000002160566	<input type="checkbox"/>	normal	DEAD @ PIRMSA	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
00068946C1	PROGENSA2	F2	April 12, 2010			<input type="checkbox"/>	normal	TAGGING @ Andalucía	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
0006895813	PROGENSA2	F2	April 12, 2010			<input type="checkbox"/>	normal	TAGGING @ Andalucía	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
000689523D	PROGENSA2	F2	April 12, 2010			<input type="checkbox"/>	normal	TAGGING @ Andalucía	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
0006895A28	PROGENSA2	F2	April 12, 2010			<input type="checkbox"/>	normal	TAGGING @ Andalucía	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
0006E4606A	PROGENSA2	F2	April 12, 2010	936000002067122	936000002072813	<input type="checkbox"/>	normal	DEAD @ PIRMSA	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
0006E4570D	PROGENSA2	F2	April 12, 2010	936000002104521	936000002104738	<input type="checkbox"/>	normal	DEAD @ PIRMSA	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
0006E46880	PROGENSA2	F2	April 12, 2010			<input type="checkbox"/>	normal	TAGGING @ Andalucía	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
0006E47213	PROGENSA2	F2	April 12, 2010			<input type="checkbox"/>	normal	TAGGING @ Andalucía	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
0006E4A48D	PROGENSA2	F2	April 12, 2010			<input type="checkbox"/>	normal	TAGGING @ Andalucía	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
0006E4B28D	PROGENSA2	F2	April 12, 2010			<input type="checkbox"/>	normal	TAGGING @ Andalucía	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
0006E49553	PROGENSA2	F2	April 12, 2010			<input type="checkbox"/>	normal	DEAD @ PIRMSA	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
0006E49C74	PROGENSA2	F2	April 12, 2010			<input type="checkbox"/>	normal	TAGGING @ Andalucía	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
0006E4974E	PROGENSA2	F2	April 12, 2010	936000002104521	936000002070480	<input type="checkbox"/>	normal	DEAD @ PIRMSA	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
0006E49F7A	PROGENSA2	F2	April 12, 2010	936000002067184	936000002066840	<input type="checkbox"/>	normal	DEAD @ PIRMSA	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
0006E4A03F	PROGENSA2	F2	April 12, 2010			<input type="checkbox"/>	normal	DEAD @ PIRMSA	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

Per page: 20
 Displaying Specimen 1 - 20 of 17686 in total
 Download: CSV XML JSON

Figura 41. comienzo de navegación en la base de datos por *Specimens*.

Filters

Generation name

Generation code

Pit TAG (TAG1,TAG2,...)

Father id

Mother id

Birth date
 From To

Alive

Role

Has measurements?

Measurement code

Has measurements comments?

Measurements comments contains

With Photos

Biosamples

Biosamples stored at

SSRs Locus

SSRs Alele

Figura 42. Presentación de todas las opciones para filtrar que se pueden usar para escoger un subconjunto de datos de *SaurataDB*

Saurata Database

Specimen / PIT: 0006E9F7A/PROGENSA2 - ALIVE

Specimen Details

Pit: 0006E9F7A

Generation: PROGENSA2 F20

Birth Date: April 12, 2010

Father: 53600000061384

Mother: Empty

Alive:

Role: normal

Comments: Empty

Measurements

Growth direct measurements table

In Date	Code	Comments	WEIGHT	LENGTH
14/10/23	1948		438.20	27

Growth image measurements table

In Date	Code	Comments	AREA_TORSION	AREA_FILET	EXCISENT_PEZ	EXCISENT_CARNEZ
14/10/23	1948		203.54	141.50	0.87	0.41

Specimen quality direct measurements table

In Date	Code	Comments	VISCERAL_FAT	DRESSED_WEIGHT	FILLETS_WEIGHT	FILLETS_YIELD	COLLAGEN	PROFREN
14/10/23	1948		14.32	389.80	147.80	38.39	0.92	21.38

Specimen quality indirect measurements table

In Date	Code	Comments	CARCASS_WEIGHT_RATE
14/10/23	1948		91.03

Genotype

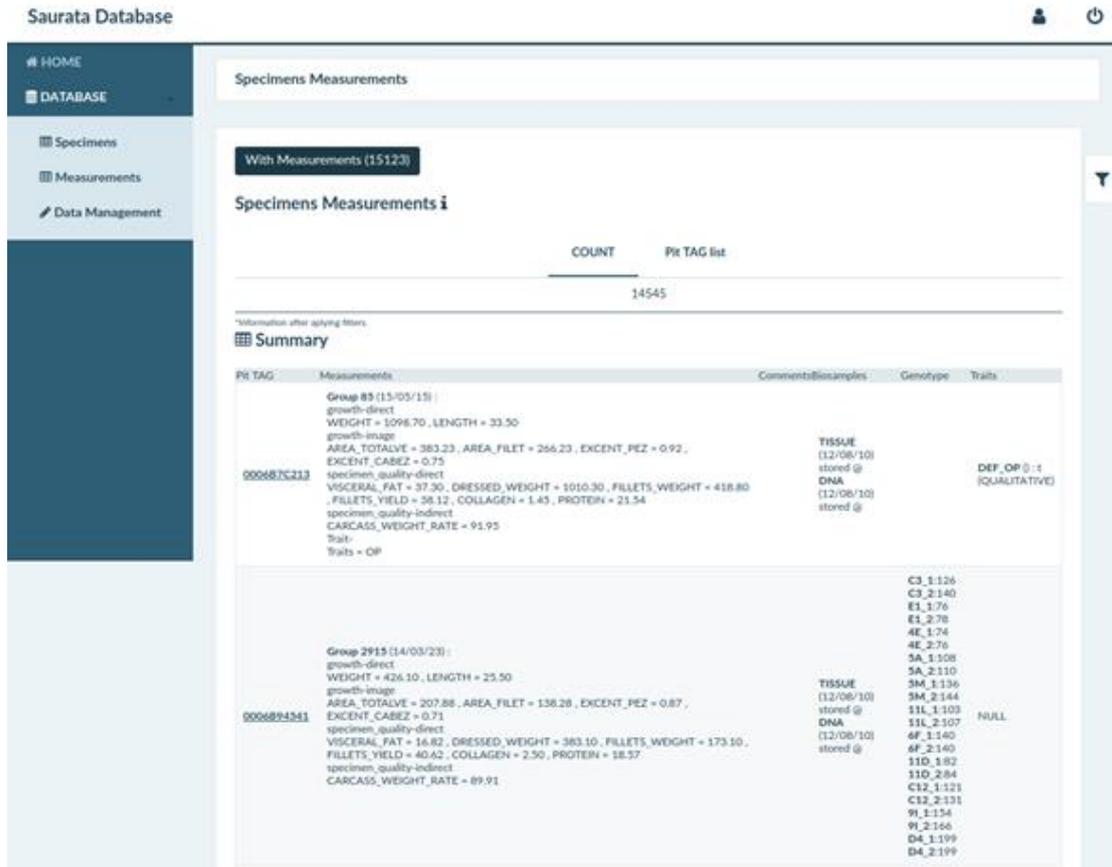
Locus	Alele	Date	Tank	Reason	Facility
CS1,1	124	12/04/10	48REDFING	ORIG	Canarias
CS1,2	124	13/04/10	LARVAL	ORIG	Subtropical
EL1,1	76	12/04/10	TAGGING	ORIG	Andalucía
EL1,2	84	11/12/10	TAGGING	ORIG	Andalucía
HE1,1	82	14/10/23	DEAD	ORIG	PRUSA
HE1,2	84				
SA1,1	108				
SA1,2	110				
SM1,1	140				
SM1,2	148				
SL1,1	103				
SL1,2	109				
SP1,1	130				
SP1,2	140				
SD1,1	76				
SD1,2	92				
CS1,1	124				
CS1,2	124				
PL1,1	124				
PL1,2	124				

Comments (0)

No comments yet.

Figura 43. Ejemplo de cómo se muestra toda la información sobre un pez

Si elegimos navegar a través de *Measurements*, en la figura 44 se muestra que aparece una tabla que presenta de manera compacta todas las medidas realizadas sobre cada ejemplar, rescatando la información desde las tablas relacionadas. También están disponibles los mismos filtros que se muestran en la figura 44.



The screenshot displays the 'Saurata Database' interface. On the left is a sidebar with navigation links: HOME, DATABASE, Specimens, Measurements, and Data Management. The main area is titled 'Specimens Measurements' and shows a summary for a group of specimens. The summary includes the following data:

PR TAG	Measurements	Comments@Biosamples	Genotype	Traits	
0006875213	Group 85 (13/03/13) growth-direct WEIGHT = 5096.70, LENGTH = 33.50 growth-image AREA_TOTALIVE = 383.23, AREA_FILET = 266.23, EXCENT_PEZ = 0.92, EXCENT_CABEZ = 0.75 specimen_quality-direct VISCERAL_FAT = 37.50, DRESSED_WEIGHT = 5010.30, FILLETS_WEIGHT = 418.80 FILLETS_YIELD = 38.12, COLLAGEN = 1.45, PROTEIN = 21.54 specimen_quality-indirect CARCASS_WEIGHT_RATE = 91.95 Trait: Traits = OP			TISSUE (12/08/10) stored @ DNA (12/08/10) stored @	DEF_OP @ :1 (QUALITATIVE)
0006894341	Group 2915 (14/03/23) growth-direct WEIGHT = 426.10, LENGTH = 25.50 growth-image AREA_TOTALIVE = 207.88, AREA_FILET = 138.28, EXCENT_PEZ = 0.87, EXCENT_CABEZ = 0.71 specimen_quality-direct VISCERAL_FAT = 16.82, DRESSED_WEIGHT = 383.10, FILLETS_WEIGHT = 173.10, FILLETS_YIELD = 40.62, COLLAGEN = 2.50, PROTEIN = 18.57 specimen_quality-indirect CARCASS_WEIGHT_RATE = 89.91			TISSUE (12/08/10) stored @ DNA (12/08/10) stored @	NULL

Below the summary, there is a 'Pit TAG list' showing a list of specimen IDs and their corresponding measurements, such as C3_1_126, C3_2_140, E1_1_76, E1_2_78, etc.

Figura 44. Aspecto de la ventana de navegación a través de *Specimens*

Otra funcionalidad destacable que comparten los recursos *Specimens* y *Measurements* es la capacidad de rescatar, a través de la pestaña Pit TAG list, la lista de especímenes presentes en la selección tras el filtrado. Esta lista puede incorporarse a cualquiera de los dos recursos para restaurar la selección. Por ejemplo, tras realizar un cribado en *Measurements* gracias a los filtros presentes en este recurso, es posible exportar los datos desde *Specimens* en formato CSV.

5. Gestión

Tanto *Specimens* como *Measurements* están accesibles para todos los usuarios de la web. No obstante se han creado otros recursos, específicos para la manipulación de la información almacenada, solo accesibles para los editores y administradores del sitio, garantizando la integridad de la misma. Los editores podrán editar algunas de las tablas presentes en la base de datos. Incluso les es posible añadir información a especímenes preexistentes, como grupos de medidas o muestras biológicas. Con el objeto de facilitar esta competencia, se generó el recurso Data Management (Figura 45), que muestra para cada ejemplar enlaces a todos los campos editables. Tanto la edición de un dato existente como la introducción manual de un nuevo dato se hace a través de un formulario muy parecido (Figura 46).

Saurata Database

HOME DATABASE Specimens Measurements Data Management

Data Management

Data Management Basics

Info

The table below includes all editable fields for a specific specimen, also includes links to add new information. To create new specimens you need to submit a spreadsheet with all specimens data.

By specimen

Pit TAG	Measurement Groups	Biosamples	SSRs	Traits	
0006B79D8D		*Biosample: TISSUE *Biosample: DNA	*SSRs(locus):	NULL	New Measurement Group New Biosample New SSR
0006B7A700		*Biosample: TISSUE *Biosample: DNA	*SSRs(locus):	NULL	New Measurement Group New Biosample New SSR
0006B7BDAB		*Biosample: TISSUE *Biosample: DNA	*SSRs(locus):	NULL	New Measurement Group New Biosample New SSR
0006B7C213	*Group: 85 *Measurements: WEIGHT LENGTH AREA TOTALVE AREA FILET EXCENT PEZ EXCENT CABEZ VISCERAL FAT DRESSED WEIGHT FILLETS WEIGHT FILLETS YIELD COLLAGEN PROTEIN CARCASS WEIGHT RATE Traits	*Biosample: TISSUE *Biosample: DNA	*SSRs(locus):	*Traits: DEF_OP	New Measurement Group Add Measurement to Group 85 New Biosample New SSR

Figura 45. Campos editables por el usuario con permisos de edición

Queda reservado únicamente al administrador la creación de especímenes, generaciones, lotes, tanques, instalaciones o movimientos de tanque, dado que esta información se crea a través de la importación masiva de datos desde hojas de cálculo que elaboran los grupos de investigación. Para ello se ha creado una tarea específica en la aplicación de *Ruby-on-Rails* que solo es eficaz si se tienen los permisos de administración.

De igual forma, la creación, edición o eliminación de usuarios recae exclusivamente sobre los administradores. Esta gestión es trivial dado que se ha generado un nuevo recurso, nombrado como *USERS* al que solo puede acceder alguien con permisos de administración, cuya interfaz se muestra en la figura 47.

Saurata Database 👤 🔌

HOME DATABASE USERS

Edit Measurement

Measurementgroup* #<Measurementgroup:0x007f79b61f62d8>

Measurementcategory* #<Measurementcategory:0x00000005e15c58>

Name WEIGHT

Value 1098.7

Tags

Update Measurement Cancel

Saurata Database 👤 🔌

HOME DATABASE USERS

New Measurement

Measurementgroup* #<Measurementgroup:0x007f79b1a73aa0>

Measurementcategory*

Name

Value

Tags

Create Measurement Cancel

Figura 46. Ejemplos de los formularios de edición (arriba) y adición (abajo) a los que tiene acceso el usuario con permisos de edición

Saurata Database 👤 🔌

HOME DATABASE USERS

Users New User

Id	Email	Role	Current Sign In At	Sign In Count	Created At	
3	user@example.com	user	March 12, 2018 11:05	4	March 06, 2018 10:41	View Edit Delete
2	editor@example.com	editor	March 06, 2018 11:20	1	March 06, 2018 10:41	View Edit Delete
1	admin@example.com	admin	March 12, 2018 11:10	8	March 06, 2018 10:41	View Edit Delete

Displaying all 3 Users
Download: CSV XML JSON

Figura 47. Interfaz de USERS para la administración de los tipos de usuarios

6. Cálculos con *Wombat*

Ahora mismo es posible filtrar los datos que se quieren analizar y guardarlos como un CSV que se utilizará para alimentar el programa *Wombat* (una herramienta para análisis genéticos cuantitativos en línea de comandos). Ya hemos automatizado la tarea con la que se obtiene automáticamente el fichero de parametrización de *Wombat* para los datos que se van a alimentar. Solo los falta conectar directamente el programa con la base de datos para que no haga falta la exportación.

ACTIVIDAD-A.5

07. Jornadas de transferencia de conocimiento, como una herramienta básica para poner en manos de todo el sector empresarial español de dorada el conocimiento producido así como las herramientas desarrolladas, y las empresas no participantes pero si interesadas puedan incorporar la mejora genética a su estructura de producción

Tarea A.5-1. JORNADAS DE TRANSFERENCIA

Las jornadas de Transferencia han consistido en reunir a todo los agentes socio-económicos del sector de la acuicultura en dorada, al objeto de:

- recoger toda la problemática del mismo
- estructurar el proyecto acorde a la demanda empresarial
- mostrar los resultados obtenidos en el proyecto PROGNSA-III

Para ello, fueron programadas dos jornadas de transferencia, para lo cual se contó con la colaboración de REMA, APROMAR y ASEMA. Una reunión en el primer año del proyecto, la cual celebrada en la Universidad Politécnica de Valencia, bajo la dirección de Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC). Una segunda reunión en el segundo año del proyecto, la cual fue celebrada en las instalaciones del IFAPA y bajo la dirección del IFAPA.

Primera jornada de transferencia: SEMINARIO DE COORDINACIÓN PROYECTO PROGNSA-III

Esta primera jornada fue organizada después de llevarse a cabo varias reuniones con el sector de producción español, tanto vía telefónica como vía Skype, o físicamente en las instalaciones de MAPAMA, personalizado en D. Juan Manuel Fernández Aldana y D. Javier Ojeda. Se decidió llevar a cabo una de las jornadas en la región de levante y otra en la región atlántica.



La jornada del levante, se llevó a cabo en las instalaciones de la Universidad Politécnica de Valencia, que fue organizada por REMA, bajo la [coordinación del CSIC](#), y cuya agenda realizada se relaciona a continuación:



SEMINARIO DE COORDINACIÓN PROYECTO PROGNSA III

MEJORA DE LA COMPETITIVIDAD DEL SECTOR DE LA DORADA A TRAVÉS DE LA SELECCIÓN GENÉTICA (PROGENSA@-III)

Fecha de celebración: 5 de Abril de 2017.

Lugar: Escuela Técnica Superior de Ingeniería Agronómica y del Medio Natural
Universidad Politécnica de Valencia
Edificio 3P. Planta baja. Sala de Juntas Camino de Vera, s/n .VALENCIA

Horario

Recepción Asistentes: 10:30h.
Inicio Seminario: 11:00h.

AGENDA SEMINARIO:

11,00-11,15: Apertura y Bienvenida asistentes.
Alberto San Bautista. *ETS de Ingeniería Agronómica y del Medio Natural.*
Paloma Carballo Tejero. *MAGRAMA.*
Javier Ojeda *APROMAR.*

11,15-11,40: Contexto, objetivos y logros: PROGNSA III
Juan Manuel Afonso López - *ULPGC.*

11,40-12,05: Estructura y diseño de PROGNSA-III (Actividad-1) y Bases de Datos (Actividad-4).
Manuel Manchado Campaña & M^a Concepción Berbel Vecino - *IFAPA.*

12,05-12,30: Control de rendimientos y genealógico (Actividad-1).
Eva Armero Ibáñez & Emilio María Dolores Pedrero - *UPCT.* Juan Manuel Afonso López - *ULPGC.*

12,30- 12,55: Interacción Nutrición-Genoma (Actividad-2).
Jaume Pérez Sánchez - *CSIC*

12,55-13,20: Infecciones experimentales (Actividad-3).
Alicia García Alcázar, Marta Arizcun Arizcun & Elena Chaves Pozo - *IEO.*

13,20 -14,00 Coloquio y Discusión entre los asistentes.
Moderado por Juan M. Fdez. Aldana - *REMA*

14,00: Clausura

Notas:

- Seminario reservado a las empresas socias de APROMAR.
- Para la asistencia al Seminario se requiere inscripción previa en el correo: aldana.rema@apromar.es
- Comida optativa en restaurante Galileo Galilei. Avda. de los Naranjos s/n. (Junto a la ETS)

En dichas jornadas, celebradas el 5 de abril de 2017, Valencia, se hizo una [presentación de PROGNSA-III](#) en su conjunto así como de cada una de las actividades de desarrollar. Como

sector empresarial asistió ASEMA, APROMAR, ANDRÓMEDA, CULMAREX, GRUPO AQUANARIA (antiguo grupo tinameno), NATURISH.



Segunda jornada de transferencia: JORNADA DE TRANSFERENCIA DEL PROYECTO PROGENSA III PARA LA MEJORA DE LA COMPETITIVIDAD DEL SECTOR DE LA DORADA A TRAVÉS DE LA SELECCIÓN GENÉTICA

Esta segunda jornada, celebrada el 27 de septiembre de 2018, fue organizada por [el Instituto de Investigación y Formación Agraria y Pesquera \(IFAPA\)](#), en las instalaciones del IFAPA, bajo el programa diseñado por REMA y APROMAR. En dichas jornadas se presentaron todos los resultados llevados a cabo en cada una de sus actividades.

La reunión fue atendida por las autoridades de la Junta de Andalucía y la dirección del IFAPA, y a la que asistieron las empresas del sector en acuicultura de dorada, así como universidades e instituciones públicas de ámbito regional (ASEMA) y nacional (JACUMAR).



IFAPA

Instituto de Investigación y Formación Agraria y Pesquera

Jornada de transferencia del proyecto PROGENSA III para la mejora de la competitividad del sector de la dorada a través de la selección genética

Andalucía se mueve con Europa

27 de Septiembre de 2018. Instalaciones Centro IFAPA El Toruño

- 09:30 **Apertura y bienvenida**
- 09:50 **Presentación del proyecto PROGENSA-III**
- 10:00 **Estudio del crecimiento y calidad del pez en doradas producidas en jaulas y estanques de tierra**
Juan Manuel Afonso (*Universidad de Las Palmas de Gran Canaria*)
- 10:30 **Estudio del rendimiento canal y calidad de la carne en dorada**
Eva Armero (*Universidad politécnica de Cartagena*)
- 11:00 **Interacción Nutrición x Genoma en dorada: crecimiento y salud intestinal**
Jaume Pérez (*CSIC-Torre de la Sal*)
- 11:30 **Descanso**
- 12:00 **Estudio genético de la resistencia a infecciones por linfocistivirus en dorada**
Manuel Manchado (*Instituto de Investigación y Formación Agraria y Pesquera*)
- 12:30 **Estudio genético de la resistencia a infecciones bacterianas en dorada**
Elena Chaves (*Instituto Español de Oceanografía*)
- 13:00 **Bioinformática para facilitar la selección genética en acuicultura**
Gonzalo Claros (*Universidad de Málaga*)
- 13:30 **Descanso**
Moderador: Juan Manuel Fernández Aldana (*REMA-APROMAR*)
- 15:30 **Coloquio**
- 16:30 **Conclusiones y cierre**

Información y confirmación:

Garazi Rodríguez email: garazi@apromar.es



Instituto de Investigación y Formación Agraria y Pesquera
CONSEJERÍA DE AGRICULTURA, PESCA Y DESARROLLO RURAL



4.3. Adecuación al cronograma de trabajo

Indicar el cumplimiento de los plazos previstos para la ejecución de las actividades. En caso de que no se hayan cumplido los plazos previstos para alguna actividad, indicar las causas.

Los plazos de cada una de las actividades se han ido desarrollando en plazo y forma, a pesar de que los condicionantes biológicos de la especie no son fáciles de controlar en ocasiones, como es el caso de la sincronización de la puesta al objeto de llevar a cabo a la misma vez la recogida de puestas, evitando así el efecto de la edad sobre la medición de los caracteres.

Tal y como se explicó previamente en el apartado 4.1. Cambios en el cronograma de trabajo, sí que se han adelantado algunas partes de algunas tareas, al objeto de poder sincronizar las agendas de gestión del proyecto con las biológicas de los experimentos. Pero que en ningún caso han afectado al cumplimiento de los plazos previstos.

4.4. Seguimiento de indicadores de ejecución y evaluación del proyecto

Incluir la valoración, a ser posible cuantificada, de los indicadores contemplados en la memoria científico-técnica.

Como indicadores de seguimiento del proyecto se indicaron en la memoria del proyecto PROGENSA-III, los siguientes indicados en la tabla,

COMPROMETIDO EN EL PROYECTO			EJECUTADO
Indicadores de Realización (IR)	Unidad	Valor esperado	Valor alcanzado a 31.03.2019
Entidades y Asociaciones que han colaborado en el desarrollo del proyecto	Nº	12 ^a	CULMASUR MARESA PIMSA AQUANARIA NATURISH ASEMA REMA APROMAR CULMAREX ANDRÓMEDA UMA UCA
Producción de lotes de familias producidos mediante puestas masales para evaluación	Nº	5	5
Producción de lotes de familias de alto, medio y bajo crecimiento (EBV) para experimentos de eficiencia energética	Nº	2	8
Intercambios de peces entre comunidades	Nº	8	6
Experiencias de campo para evaluación de caracteres	Nº	4 ^b	4

Evaluaciones para caracteres de crecimiento y calidad	Nº	3 ^c	3
Evaluaciones de resistencia a patógenos	Nº	6	4
Genotipado de individuos	Nº	14.000 ^d	10.000
Banco de muestras	Nº	14.000 ^d	10.000
Reuniones de seguimiento	Nº	2	7
Experiencias en colaboración empresa-OPI	Nº	4	5
Difusión de resultados	Nº	6	31

^a En el conjunto de todas las generaciones participan 24 instituciones públicas y privadas, más las administraciones de las CCAA de Andalucía, Canarias, Cataluña y Murcia.

^b Sería 5 si se hace la talla de un lote al kilo.

^c Sería 4 si se hace la talla de un lote al kilo.

^d Dependiendo de que todos los muestreos vayan perfectos y qué % de robos esté dentro de los valores estimados.

COMPROMETIDO EN EL PROYECTO			EJECUTADO
Indicadores de Resultado	Unidad	Valor esperado	Valor alcanzado a 31.03.2019
Nuevas tecnologías desarrolladas	Nº	2	2
Empresas y PYMEs que se han beneficiado de resultados de los proyectos llevados a cabo	Nº	5	CULMASUR MARESA AQUANARIA PIMSA ASEMA REMA
Caracteres de <i>crecimiento</i>	Nº	3	3
Caracteres <i>morfológicos</i>	Nº	18	18
Caracteres de <i>rendimiento</i>	Nº	6	6
Caracteres de <i>calidad de la carne</i>	Nº	4	4
<i>Resistencia a enfermedades</i>	Nº patógenos	4	4
Caracteres interacción nutrición x genoma	Nº	4	4
Biomarcadores interacción nutrición x genoma	Nº	20	30
Integración de bases de datos	Nº	1	1
Número de registros fotográficos	Nº	3.000 ^d	4.000
Número de animales con sangre en banco	Nº	10.000 ^d	10.000
Número de Rx	Nº	3.000 ^d	500
Página web	Nº	1	1
Eventos organizados	Nº	2	2

^d Dependiendo de que todos los muestreos vayan perfectos y qué % de robos esté dentro de los valores estimados

COMPROMETIDO EN EL PROYECTO			EJECUTADO
Indicadores de Impacto	Unidad	Valor esperado	Valor alcanzado a 31.03.2019
Nuevas tecnologías transferidas a las empresas, PYMEs y/o entidades de gestión (Nº)	Nº	2	2
Redes de cooperación establecidas	Nº	3	ASEMA REMA APROMAR
Número de animales evaluados (incluyendo reproductores en OPI y empresas)	Nº	9.900 ^d	10.500
Empresas que usan animales evaluados en su explotación	Nº	5	CULMASUR MARESA PIMSA AQUANARIA SONRIONANSA*
Progreso en crecimiento por la mejora	%	10 ^e	20% (élite vs control)
Reducción en Incidencia estimada de enfermedades	%	15	11-12%

^d Dependiendo de que todos los muestreos vayan perfectos y qué % de robos esté dentro de los valores estimados.

^e Estimación media que dependerá de varios factores experimentales (reproductores que se apareen, proporción de machos y hembras obtenidas, etc..)

* En negociaciones con el resto de empresas para incorporar animales de alto valor genético en su núcleo de reproductores

4.5. Transferencia de resultados al sector

Indicar las actuaciones dirigidas a la validación y transferencia de resultados a las empresas, incluyendo:

- descripción de las actuaciones realizadas,
- resultados obtenidos,
- valoración del grado de implicación y colaboración de las empresas,
- valoración de la viabilidad de la implementación de los resultados en empresas,
- aspectos a mejorar para una transferencia de resultados más efectiva

Se han transferido puestas fecundadas de los lotes de selección de IFAPA y ULPGC tanto F1 como F2 a criaderos localizados en Andalucía y Canarias. En total se estima, más de 20 millones de huevos a cada una de las dos empresas andaluzas (MARESA y CULMASUR) y reproductores de élite de la F3 (5.500 animales) en Canarias a la empresa AQUANARIA. Además, ha habido reuniones con ASEMA para explicar el plan y la coordinación de acciones para aplicar la genética en las explotaciones de la región. En dichas transferencias, se han realizado experiencias conjuntas como la creación de grupos centinelas para la detección de enfermedades posibilitando la interacción con los técnicos de las empresas y el intercambio de tecnologías.

También se han hecho siembras en campo y evaluaciones en campo con las empresas PIMSA, AQUANARIA (en ADSA) y SERVICIOS ATUNEROS DEL MEDITERRÁNEO, estableciendo

comparaciones *in situ* entre animales procedentes de los mismos lotes genéticos, clases año 2016 y 2017. Los resultados de los análisis de los muestreos al sacrificio se están elaborando en este momento para la clase año 2016, ya que fueron muestreados los animales en el mes de noviembre de 2017, sobre un total de al menos unos 2.400 animales.

Las empresas colaboradoras están totalmente implicadas en el proyecto PROGNSA-III, participando en los diseños llevados a cabo en sus propias instalaciones, asumiendo costes de producción y logística para que los resultados tengan validez industrial en la condicione de producción de las empresas. Todo esto es de gran relevancia porque está haciendo que los resultados de PROGNSA-III sean de aplicación inmediata al sector, ya que los resultados derivados de los muestreos provienen de peces que están siendo cultivados en las instalaciones de las empresas productoras y bajo sus condicionantes industriales, lo que hace que la transferencia es inmediata.

4.6. Actuaciones de difusión y publicidad de las ayudas

Incluir relación de las actividades de difusión y publicidad (adjuntar información sobre estas actividades o enlaces a páginas web)

Durante este periodo de ejecución de PROGNSA-III, se han llevado a cabo varias acciones de difusión del proyecto así como de las instituciones participantes y financiadoras, las cuales se relacionan a continuación:

- En el **XVI Congreso Nacional de Acuicultura (XVI CNA)**, mediante la charla invitada en la SESIÓN de PLANES JACUMAR, moderado por D. Salvador Cárdenas Rojas (SEA) y organizador por MAPAMA-SGP

(http://www.seacongresos.org/images/stories/PDFs/PROGRAMA_XVI_CNA_WEB.pdf):

MEJORA DE LA COMPETITIVIDAD DEL SECTOR DE LA DORADA A TRAVÉS DE LA SELECCIÓN GENÉTICA (PROGNSA-III).

- Seminario de coordinación: **PROYECTO PROGNSA- III**. Abril de 2017, Universidad Politécnica de Valencia, Valencia.

- En MisPeces.com a través de la noticia titulada: **Estos son los tres proyectos beneficiarios de las ayudas del Plan Nacional de Acuicultura 2016**

(<http://www.mispecies.com/nav/actualidad/noticias/noticia-detalle/Estos-son-los-tres-proyectos-beneficiarios-de-las-ayudas-del-Plan-Nacional-de-Acuicultura-2016/#.Wh78o3nfP3g>)

- En MisPeces.com a través de la noticia titulada: **Científicos y sector productor de dorada coordinan las próximas acciones de Progensa III**

(<http://www.mispecies.com/nav/actualidad/noticias/noticia-detalle/Cientificos-y-sector-productor-de-dorada-coordinan-las-prximas-acciones-de-Progensa-III/#.Wh79C3nfP3g>)

- En MisPeces.com a través de la noticia titulada: **Ignacio de la Rosa propone la puesta en marcha de un plan regional de mejora genética en dorada**

(<http://www.mispecies.com/nav/actualidad/noticias/noticia-detalle/Ignacio-de-la-Rosa-propone-la-puesta-en-marcha-de-un-plan-regional-de-mejora-gentica-en-dorada/#.Wh79W3nfP3g>)

- En MisPeces.com a través de la noticia titulada: **Expertos proponen crear núcleos de selección de dorada para seguir desarrollando la mejora genética de la especie** (<http://www.mispeces.com/nav/actualidad/noticias/noticia-detalle/Expertos-proponen-crear-nucleos-de-seleccin-de-dorada-para-seguir-desarrollando-la-mejora-gentica-de-la-especie/#.Wh79n3nfP3g>)
- En MisPeces.com a través de la noticia titulada: **Progensa III comienza la evaluación de resultados de la F3 de la dorada de crianza** (<http://www.mispeces.com/nav/actualidad/noticias/noticia-detalle/Progensa-III-comienza-la-evaluacin-de-resultados-de-la-F3-de-la-dorada-de-crianza/#.Wh79z3nfP3g>)
- En Ipacuicultura.com a través de la noticia titulada: **El Plan Nacional sobre selección genética de dorada, Prongensa III, se desarrollará en gran parte en Murcia** (http://www.ipacuicultura.com/noticias/ultima_hora/53150/el_plan_nacional_sobre_seleccion_genetica_de_dorada_prongensa_iii_se_desarrollara_en_gran_parte_en_murcia.html)
- En Ipacuicultura.com a través de la noticia titulada: **La Red de Experimentación Marina de Acuicultura (REMA) transferirá los resultados obtenidos del proyecto PROGENSE III al sector** (http://www.ipacuicultura.com/noticias/ultima_hora/53271/la_red_de_experimentacion_marina_de_acuicultura_rema_transferira_los_resultados_obtenidos_del_proyecto_progensa_iii_al_sector.html)
- En Ipacuicultura.com a través de la noticia titulada: **Progensa III, camino hacia la mejora de la competitividad en dorada** (http://www.ipacuicultura.com/noticias/ultima_hora/55046/progensa_iii_camino_hacia_la_mejora_de_la_competitividad_en_dorada_.html)
- En Ipacuicultura.com a través de la noticia titulada: **El IFAPA comienza la evaluación de la nueva generación F3 de doradas en el marco de PROGENSE III** (http://www.ipacuicultura.com/noticias/en_portada/59116/el_ifapa_comienza_la_evaluacion_de_la_nueva_generacion_f3_de_doradas_en_el_marco_de_progensa_iii.html)
- En ulpgc.es a través de la noticia titulada: **La ULPGC, la universidad con mayor financiación en las ayudas a la investigación de los Planes Nacionales de Acuicultura** (<https://www.ulpgc.es/noticia/ulpgc-universidad-mayor-financiacion-ayudas-investigacion-planes-nacionales-acuicultura>)
- En MisPeces.com a través de la noticia titulada: **Investigadores de Progensa III se encuentran inmersos en el desarrollo de la tercera generación de doradas mejoradas genéticamente** (<http://www.mispeces.com/nav/actualidad/noticias/noticia-detalle/Investigadores-de-Progensa-III-se-encuentran-inmersos-en-el-desarrollo-de-la-tercera-generacin-de-doradas-mejoradas-genticamente/#.XKEBVqSCFPY>)
- En MisPeces.com a través de la noticia titulada: **IFAPA Centro El Toruño abordará la mejora genética en dorada a través de una jornada** (<http://www.mispeces.com/nav/actualidad/noticias/noticia-detalle/IFAPA-Centro-El-Toruño-abordar-la-mejora-gentica-en-dorada-a-travs-de-una-jornada/#.XKEB8aSCFPY>)

- En MisPeces.com a través de la noticia titulada: **IFAPA Centro El Toruño acoge hoy la jornada de transferencia de resultados de PROGENSA III** (<http://www.mispecies.com/nav/actualidad/noticias/noticia-detalle/IFAPA-Centro-El-Toruño-acoge-hoy-la-jornada-de-transferencia-de-resultados-de-PROGENSA-III/#.XKECWKSCFPY>)
- En MisPeces.com a través de la noticia titulada: **Las doradas de alto crecimiento de Progenza III pueden desarrollar una mejor respuesta inmune bacteriana** (<http://www.mispecies.com/nav/actualidad/noticias/noticia-detalle/Las-doradas-de-alto-crecimiento-de-Progenza-III-pueden-desarrollar-una-mejor-respuesta-inmune-bacteriana/#.XKECm6SCFPY>)
- En MisPeces.com a través de la noticia titulada: **Llamada de científicos y sector a dar continuidad a los programas de mejora genética en dorada** (<http://www.mispecies.com/nav/actualidad/noticias/noticia-detalle/Llamada-de-científicos-y-sector-a-dar-continuidad-a-los-programas-de-mejora-genetica-en-dorada/#.XKEC5qSCFPY>)
- En MisPeces.com a través de la noticia titulada: **Celebran en Murcia la 77 reunión JACUMAR y la 11 reunión JACUCON** (<http://www.mispecies.com/nav/actualidad/noticias/noticia-detalle/Celebran-en-Murcia-la-77-reunin-JACUMAR-y-la-11-reunin-JACUCON/#.XKEDOaSCFPY>)
- En MisPeces.com a través de la noticia titulada: **La UCA celebra el Día de la Acuicultura 2018 con la jornada "Investigar para crecer"** (<http://www.mispecies.com/nav/actualidad/noticias/noticia-detalle/La-UCA-celebra-el-Da-de-la-Acuicultura-2018-con-la-jornada-Investigar-para-crecer/#.XKEDmaSCFPY>)
- En MisPeces.com a través de la noticia titulada: **Progenza III reúne al colectivo investigador y al sector empresarial en una jornada de transferencia sobre dorada** (http://www.ipacuicultura.com/noticias/ultima_hora/64901/progenza_iii_reune_al_colectivo_investigador_y_al_sector_empresarial_en_una_jornada_de_transferencia_sobre_dorada.html)
- En ipacuicultura.com a través de la noticia titulada: **El proyecto PROGENSA III celebrará en septiembre una jornada de transferencia en el IFAPA El Toruño** (http://www.ipacuicultura.com/noticias/eventos/63656/el_proyecto_progenza_iii_celebrara_en_septiembre_una_jornada_de_transferencia_en_el_ifapa_el_toruno.html)
- En la página web del CSIC a través de la noticia titulada: **PROGENSA III** (<http://iats.csic.es/progenza-iii/>)
- En la página web del CSIC a través de la noticia titulada: **FISH TAGGING_PROGENSA-III** (http://iats.csic.es/fish-tagging_progenza-iii/)
- En la website de JACUMAR: **RESUMEN DEL PROYECTO MEJORA DE LA COMPETITIVIDAD DEL SECTOR DE LA DORADA A TRAVÉS DE LA SELECCIÓN GENÉTICA (PROGENSA-III)** (https://www.mapa.gob.es/app/jacumar/planes_nacionales/Documentos/121_RP_PROGENSA_III.pdf)
- En la página del periódico de La Vanguardia a través de la noticia titulada: **Ifapa El Toruño reúne a investigadores y empresarios en torno a un proyecto para mejorar el sector acuícola** (<https://www.lavanguardia.com/local/sevilla/20180927/452057942295/ifapa-el-toruno-reune-a-investigadores-y-empresarios-en-torno-a-un-proyecto-para-mejorar-el-sector-acuicola.html>)

- En la página de la ULPGC a través de la noticia titulada: **PROGENSA III BUSCA UNA DORADA DE CALIDAD A TRAVÉS DE LA SELECCIÓN GENÉTICA** (http://ecoaqua.ulpgc.es/ecoaqua_project/node/115)

- En la página de la ULPGC a través de la noticia titulada: **La ULPGC, la universidad con mayor financiación en las ayudas a la investigación de los Planes Nacionales de Acuicultura** (<https://www.ulpgc.es/noticia/ulpgc-universidad-mayor-financiacion-ayudas-investigacion-planes-nacionales-acuicultura>)

- En TWITTER a través @PROGENSA3: **PROGENSA** (<https://twitter.com/PROGENSA3>)

- En revistas de investigación:

- Erick Pereraa, Paula Simó-Mirabeta, Hyun Suk Shinb, Enrique Rosell-Molla, Fernando Naya-Cataláa, Verónica de las Herasa, Juan Antonio Martos-Sitchaa*, Vasileios Karalazosc, Eva Armerod, Marta Arizcune, Elena Chavese, Concepción Berbelf, Manuel Manchadof, Juan Manuel Afonsob, Josep Calduch-Ginera, Jaume Pérez-Sáncheza**.
Selection for growth is associated in gilthead sea bream (*Sparus aurata*) with diet flexibility, changes in growth patterns and higher intestine plasticity. *AQUACULTURE* (en revision)
- **Heritability estimates and genetic correlation for growth traits and LCDV susceptibility in gilthead sea bream (*Sparus aurata*).** *AQUACULTURE* (en prepración)

4.7. Valoración del coordinador sobre la ejecución del proyecto

Incluir valoración general sobre el desarrollo del proyecto, consecución de objetivos, etc. Recomendaciones y sugerencias.

PROGENSA – III es un Proyecto Nacional coordinado que requiere de la participación de agentes investigadores (centros de investigación y universidades), administración especializada (MAPAMA) y empresas del sector (REMA, ASEMA, APROMAR), para poder alcanzar los objetivos altamente aplicados del mismo. Ello hace que toda la información que es producida en el marco de PROGENSA, sea aplicada de manera inmediata al sector, ya que el algoritmo desarrollado en el marco del proyecto contiene todos aquellos factores industriales de producción determinantes para el éxito de la transferencia.

PROGENSA-III lleva una evolución adecuada y acorde a los objetivos comprometidos en el documento original, si bien ha sido a la previsión y organización de toda la información que manejan los investigadores, así como al esfuerzo de acoplamiento que ha llevado a cabo el sector industrial. Ello es esencialmente debido a que el ciclo biológico completo de dorada es de tres años (intervalo entre generaciones), mientras que la convocatoria de los nuevos Planes Nacionales es de 2 años. En este sentido, consideramos esencial que en próximas convocatorias, al menos para que proyectos de la envergadura y aplicabilidad de PROGENSA puedan optar a estas fuentes de financiación, los proyectos sean de tres años de duración.

Por otro lado, creo que MAPAMA y todo su equipo han acertado con este tipo de convocatorias, porque al menos en el sector de la acuicultura, cubren de un modo muy acertado y original la problemática que tienen las empresas de la acuicultura en España, haciendo a ésta más competitiva frente a nuestros competidores europeos y extracomunitarios.

Otro de los grandes inconvenientes que he apreciado en esta convocatoria ha sido el tipo de fondos con los cuales se han llevado a cabo el proyecto PROGENSA-III, los cuales encorsetan en

exceso los experimentos biológicos. Si bien es cierto, que desde la administración nacional de la subdirección se ha hecho un esfuerzo por encima de sus posibilidades por tratar de sincronizar las limitaciones de justificación con las limitaciones mínimas que requieren los experimentos planificados en PROGENSA-III. Gracias a todo lo cual los objetivos de PROGENSA-III se han conseguido en su totalidad.

4.8. Conclusiones

Principales conclusiones de las actividades desarrolladas.

Para completar este apartado, se acompañará una presentación en Power Point (máximo 10-15 diapositivas) que incluirá los aspectos más generales de los objetivos y acciones desarrolladas y dedicará especial atención a los resultados y su utilidad para el sector acuícola.

Esta presentación podrá ser incluida en la página web de acuicultura del MAPA.

ACTIVIDAD A.1

- En las fases de crecimiento larvario y alevinaje, los descendientes del programa PROGENSA muestran pesos superiores a poblaciones naturales (poblaciones sin selección) de alrededor del 43%.
- Los descendientes de PROGENSA mostraron un crecimiento en Canarias superior a la península, un 12% con respecto a esteros.
- Los descendientes de PROGENSA (IFAPA-ULPGC) son un 11% superiores a los controles en peso, y un 33% en SGR, así como un 15% superiores en peso frente a descendientes de reproductores no seleccionados (IEO).
- Los descendientes de PROGENSA (IFAPA-ULPGC) mostraron una prevalencia muy inferior en deformidades que descendientes de reproductores no seleccionados (IEO), 7,5 veces menos.
- La heterocigosidad media de los reproductores fue de 0,81 y 0,67 para el IEO e IFAPA-ULPGC, respectivamente.
- El número de familias por reproductor contributivo fue de 3,07, a partir de un modelo de dos siembras 4DL (S1 y S3), lo que supone una mejora de la contribución del 45,5% frente a un modelo de una siembra 4DL.
- PROGENSA dispone de un banco de tejidos con control genealógico y de rendimiento de más de 10.000 muestras.
- Los caracteres de crecimiento presentaron heredabilidades entre moderadas y medias, mientras que los caracteres de rendimientos mostraron heredabilidades medias. Los caracteres de calidad de la carne presentaron heredabilidades bajas, y los caracteres de calidad morfológica fueron altas o muy altas, excepto la presencia-ausencia de cualquier tipo de deformidad que fue claramente baja.
- Las correlaciones genéticas para los caracteres de crecimiento entre sistemas de cultivo fueron altas y positivas, excepto para el peso y la talla entre TANQUE-AQUANARIA y ESTERO-PIMSA.

ACTIVIDAD A.2

- El uso de dietas con alto contenido en ingredientes vegetales, basadas en las formulaciones del Proyecto ARRINA, no compromete a escala piloto el diferente potencial de crecimiento de familias seleccionadas por un diferente potencial de crecimiento en el programa PROGENSA.

- Las diferencias de crecimiento entre familias control y “elite” reflejan una diferente dinámica (estrategia) además de una diferente potencial de crecimiento en términos absolutos.
- El patrón de expresión génica a nivel hepático y los efectos de la dieta y del genotipo sobre índices bio-métricos y órgano-somáticos ponen de relieve la diferente regulación de la deposición grasa en hígado y tejido adiposo.
- La selección por crecimiento evidencia diferentes respuestas adaptativas asociadas a cambios en la morfometría del intestino, reflejo de una diferente capacidad de digestión-absorción de nutrientes que puede verse tamponada por el uso de dietas de formulaciones extremas.
- La selección por rápido crecimiento va en detrimento de la capacidad anaeróbica, lo que puede tener consecuencias importantes sobre el comportamiento alimentario, jerarquías sociales, y otro tipo de caracteres de interés productivo como la resistencia al estrés, respuesta inmune o calidad del filete, etc.

ACTIVIDAD A.3

- El modelo umbral establece una heredabilidad media-alta para la selección de animales con distinta susceptibilidad a la infección por LCDV.
- La fase de infección tiene una influencia clara en las estimas de heredabilidad para crecimiento y susceptibilidad a LCD. En fase aguda existe una heredabilidad moderada-alta para crecimiento y susceptibilidad a la infección por *linfocistivirus*.
- El índice de gravedad fenotípica presenta una correlación genética alta y positiva con las partículas virales en hígado, lo cual indica que el método desarrollado es adecuado para la evaluación de la susceptibilidad a la infección.
- La correlación genética entre el peso y el índice de gravedad fenotípica depende de la fase de la infección, lo que indica una interferencia del virus en los procesos de crecimiento.
- Futuros estudios genómicos permitirían aumentar la precisión en la selección de animales.
- La selección por crecimiento no afecta a los síntomas de la enteritis parasitaria.
- Bajo procesos de alta infección parasitaria, la mortalidad y la pérdida de peso relativa fueron menores en familias con alto potencial de crecimiento, lo que refleja una mejor capacidad para lidiar con los signos clínicos de esta enfermedad.
- Los descendientes de reproductores de élite seleccionados para el peso mostraron una tasa de supervivencia frente a la infección por *Phb*, de un 11% más que animales provenientes de poblaciones no seleccionadas (IEO), siendo los peces más grandes.
- Los descendientes de reproductores de élite seleccionados para el peso mostraron una tasa de supervivencia frente a la infección por *Va*, de un 12% más que animales provenientes de poblaciones no seleccionadas (IEO), siendo los peces más grandes.

ACTIVIDAD A.4

- Se ha preparado un programa Base-Datos denominada SAURATADB, que permite integrar información genética y de producción, al objeto de llevar a cabo procesos de evaluación genética, de un modo seguro, rápido y práctico para las empresas.
- SAURATADB dispone de doble acceso opcional: *Specimens* y *Measurements*.

ACTIVIDAD A.5

- El cinco de abril de 2017, en la Universidad Politécnica de Valencia, se llevó a cabo con el sector empresarial, el SEMINARIO DE COORDINACIÓN PROYECTO PROGNSA-III.

- El 27 de septiembre de 2018, en el IFAPA, se llevó a cabo con el sector empresarial, la JORNADA DE TRANSFERENCIA DEL PROYECTO PROGNSA-III PARA LA MEJORA DE LA COMPETITIVIDAD DEL SECTOR DE LA DORADA A TRAVÉS DE LA SELECCIÓN GENÉTICA.

4.9. Referencias

Principales conclusiones de las actividades desarrolladas.

Para completar este apartado, se acompañará una presentación en Power Point (máximo 10-15 diapositivas) que incluirá los aspectos más generales de los objetivos y acciones desarrolladas y dedicará especial atención a los resultados y su utilidad para el sector acuícola.

Esta presentación podrá ser incluida en la página web de acuicultura del MAPA.

Benedito-Palos L, Ballester-Lozano GF, Simó P, Karalazos V, Ortiz A, Calduch-Giner JA, Pérez-Sánchez, J. Lasting effects of butyrate and low FM/FO diets on growth performance, blood haematology/biochemistry and molecular growth-related markers in gilthead sea bream (*Sparus aurata*). *Aquaculture* 454: 8-18 (2016)

J.J. Borrego, E.J. Valverde, A.M. Labella, D. Castro, Lymphocystis disease virus: its importance in aquaculture, *Rev. Aquacult.* 9 (2017) 179-193.

I. Cano, P. Ferro, M.C. Alonso, C. Sarasquete, E. Garcia-Rosado, J.J. Borrego, D. Castro, Application of in situ detection techniques to determine the systemic condition of lymphocystis disease virus infection in cultured gilt-head seabream, *Sparus aurata* L, *J Fish Dis* 32(2) (2009) 143-50.

E.R. Dempster, I.M. Lerner, Heritability of Threshold Characters, *Genetics* 35(2) (1950) 212-36.

R.M. Le Deuff, T. Renault, Lymphocystis outbreaks in farmed seabream, *Sparus aurata*, first report on French Mediterranean coast, *Bull. Eur. Ass. Fish Pathol.* 13 (1993) 130-133.

Estensoro I, Ballester-Lozano GF, Benedito-Palos L, Grammes F, Martos-Sitcha JA, Mydland L.-T, Calduch-Giner JA, Fuentes J, Karalazos V, Ortiz A, Øverland M, Sitjà-Bobadilla A, Pérez-Sánchez J. Dietary butyrate helps to restore the intestinal status of a marine teleost (*Sparus aurata*) fed extreme diets low in fish meal and fish oil. *PLoS ONE* 11:e0166564 (2016)

Estensoro I, Redondo MJ, Alvarez-Pellitero P, Sitjà-Bobadilla A. 2010 Novel horizontal transmission route for *Enteromyxum leei* (Myxozoa) by anal intubation of gilthead sea bream *Sparus aurata*. *Dis Aquat Org*, 92: 51-8.

Fox MD, Palenzuela O, Bartholomew JL. 2000. Strategies for the diagnosis of *Ceratomyxa shasta* using the polymerase chain reaction: comparison of lethal and nonlethal sampling with microscopic examination. *J Aquat Anim Health.*, 12: 100-6.

Gil-Solsona R, Calduch-Giner JA, Nacher-Mestre J, Lacalle-Bergeron L, Sancho JV, Hernández F, Pérez-Sánchez J. Contributions of MS metabolomics to gilthead sea bream (*Sparus aurata*) nutrition. Serum fingerprinting of fish fed low fish meal and fish oil diets. *Aquaculture* 498: 503-512 (2019)

M.L. Gonzalez de Canales, J.A. Munoz-Cueto, J. Arellano, A. Garcia-Garcia, C. Sarasquete, Histological and histochemical characteristics of the lymphocystis disease in gilthead seabream, *Sparus aurata* L. from the south-atlantic coast of Spain, *Eur J Histochem* 40(2) (1996) 143-52.

J.D. Hadfield, MCMC Methods for Multi-Response Generalized Linear Mixed Models: The MCMCglmm R Package, *J. Stat. Soft.* 33 (2010) 1-22.

H. Kvitt, G. Heinisch, A. Diamant, Detection and phylogeny of Lymphocystivirus in sea bream *Sparus aurata* based on the DNA polymerase gene and major capsid protein sequences, *Aquaculture* 275 (2008) 58-63.

I. Lee-Montero, A. Navarro, Y. Borrell, M. García-Celdrán, N. Martín, D. Negrín-Báez, G. Blanco, E. Armero, C. Berbel, M. J. Zamorano, J. J. Sánchez, A. Estévez, G. Ramis, M. Manchado, J. M. Afonso. Development of the first standardised panel of two new microsatellite multiplex PCRs for gilthead seabream (*Sparus aurata* L.). 213. <https://doi.org/10.1111/age.12037>

K. Meyer, WOMBAT: a tool for mixed model analyses in quantitative genetics by restricted maximum likelihood (REML), *J Zhejiang Univ Sci B* 8(11) (2007) 815-21.

Piazzon C, Galindo_Villegas J, Pereiro P, Estensoro I, Calduch-Giner JA, Gómez-Casado E, Novoa B, Mulero V, Sitjà-Bobadilla A, Pérez-Sánchez, J. Differential Modulation of IgT and IgM upon parasitic, bacterial, viral and dietary challenges in a perciform fish. *Frontiers in Immunology* 7: 637 (2016)

Piazzon MC, Calduch-Giner JA, Fouz B, Estensoro I, Simó-Mirabet P, Puyalto M, Karalazos V, Palenzuela O, Sitjà-Bobadilla A, Pérez-Sánchez J. Under Control: how a dietary additive can restore the gut microbiome and proteomic profile, and improve disease resilience in a marine teleostean fish fed vegetable diets. *Microbiome* 5:164 (2017)

Simó-Mirabet P, Felip A, Estensoro I, Martos-Sitcha JA, de las Heras V, Calduch-Giner JA, Puyalto M, Karalazos V, Sitjà-Bobadilla A, Pérez-Sánchez J. Impact of low fish meal and fish oil diets on the performance, sex steroid profile and male-female sex reversal of gilthead sea bream (*Sparus aurata*) over a three-year production cycle. *Aquaculture*, 490:64-74 (2018)

Sitjà-Bobadilla A, Palenzuela O. 2012. Enteromyxum species. En: Woo P, Buchmann K, editors. *Fish Parasites Pathobiology and Protection*. CABI; p. 163–76.

E.J. Valverde, I. Cano, D. Castro, R.K. Paley, J.J. Borrego, Rapid and Sensitive Detection of Lymphocystis Disease Virus Genotype VII by Loop-Mediated Isothermal Amplification, *Food Environ Virol* 9(1) (2017) 114-122.

M. Vandeputte, S. Mauger, M. Dupont-Nivet, An evaluation of allowing for mismatches as a way to manage genotyping errors in parentage assignment by exclusion, *6(1)* (2006) 265-267.

P.J. Walker, J.R. Winton, Emerging viral diseases of fish and shrimp, *Vet Res* 41(6) (2010) 51.