

**JACUMAR**  
**JUNTA NACIONAL ASESORA DE CULTIVOS MARINOS**

**PLANES NACIONALES DE CULTIVOS MARINOS**

**CULTIVO DE BESUGO**  
**2001-2003**

**Informe Final**

## 1. DATOS ADMINISTRATIVOS

**TITULO: Cultivo integral de Besugo (*Pagellus bogaraveo*)**

**PLAN NACIONAL DE: CULTIVO DE BESUGO**

---

### FECHAS DE REALIZACIÓN

Inicio del Plan: enero 2001

Finalización del Plan: diciembre 2003

---

### PARTICIPANTES

#### Comunidad Autónoma de Andalucía

- Consejería de Agricultura y Pesca. Centro de Investigación y Cultivo de Especies Marinas “El Toruño”

Responsable:

Apellidos: Bruzón Gallego

Nombre: M<sup>a</sup> Ángeles

Organismo: Consejería de Agricultura y Pesca.

Centro: C.I.C.E.M. “El Toruño”

Departamento:

## Comunidad Autónoma del Principado de Asturias

- Consejería de Medio Rural y Pesca

Responsable de la Comunidad Autónoma:

Apellidos: Rodríguez Rodríguez  
Nombre: Carmen  
Organismo: Consejería de Medio Rural y Pesca.  
Centro: Dirección Regional de Pesca.  
Departamento: Centro de Experimentación Pesquera

- Universidad de Oviedo

Investigador Principal. Responsable de la Universidad de Oviedo

Apellidos: Sánchez Prado  
Nombre: José Antonio  
Organismo: Universidad de Oviedo  
Centro: Facultad de Medicina  
Departamento: Biología Funcional. Área de Genética

## Comunidad Autónoma de Cantabria

- Consejería de Ganadería, Agricultura y Pesca

Responsable de la Comunidad Autónoma:

Apellidos: Lanuza Alonso  
Nombre: Paloma  
Organismo: Consejería de Ganadería, Agricultura y Pesca.  
Centro:  
Departamento: Dirección Regional de Pesca y Alimentación

- Instituto Español de Oceanografía. Centro Oceanográfico de Santander.

Investigador Principal

Apellidos: Fernández Pato  
Nombre: Carlos  
Organismo: Instituto Español de Oceanografía  
Centro: Centro Oceanográfico de Santander  
Departamento: Acuicultura

## **Comunidad Autónoma de Galicia**

- Consellería de Pesca e Acuicultura. Centro de Investigacions Mariñas.
- Instituto Español de Oceanografía. Centro Oceanográfico de Vigo.

Responsable:

Apellidos: Linares Cuerpo  
Nombre: Fátima  
Organismo: Consellería de Pesca, Marisqueo, e Acuicultura.  
Centro: Centro de Investigacions Mariñas.  
Departamento: Dirección Xeral de Recursos Mariños.

Investigador Principal: durante el año 2001

Apellidos: Peleteiro Alonso  
Nombre: José Benito  
Organismo: Instituto Español de Oceanografía.  
Centro: Centro Oceanográfico de Vigo.  
Departamento: Acuicultura.

Investigadora Principal: durante el año 2002-2003: Fátima Linares Cuerpo

---

## **DATOS DE LA COORDINADORA DEL PROYECTO**

Nombre y Apellidos: Mercedes Olmedo Herrero  
Organismo/ Centro: Instituto Español de Oceanografía. CO de Vigo.  
Departamento: Cultivos Marinos

## 2. RESULTADOS TECNICOS DEL PLAN NACIONAL

### OBJETIVOS INICIALES

#### 1. REPRODUCCIÓN

##### 1.1. ESTUDIO DE COMPORTAMIENTO EN EL MEDIO NATURAL

- 1.1.1. Seguimiento del desarrollo gonadal: determinación de la época de puesta natural.
- 1.1.2. Composición bioquímica de ejemplares procedentes del medio natural.

##### 1.2. PUESTA A PUNTO DE STOCKS DE REPRODUCTORES

- 1.2.1. Captura y transporte de reproductores.
- 1.2.2. Manejo y tratamientos preventivos.
- 1.2.3. Diseño de los tanques de reproductores.
- 1.2.4. Estudio de la alimentación de reproductores. Influencia sobre la calidad de puesta y el desarrollo embrionario.
- 1.2.5. Obtención de puestas naturales e inducidas.
- 1.2.6. Estudio de gametos: características morfológicas de espermatozoides y ovocitos.
- 1.2.7. Incubación: estudio del desarrollo embrionario, tasas fecundación y de eclosión.

#### 2. CULTIVO LARVARIO:

- 2.1. Optimización de la técnica de cultivo larvario: definición del manejo de los tanques de cultivo larvario.
- 2.2. Mejora de la secuencia alimentaria con presas vivas.
- 2.3. Estudio de los requerimientos nutritivos de las larvas. Análisis de la composición bioquímica de presas enriquecidas y larvas.
- 2.4. Definición del proceso de transición de alimento vivo a alimento inerte.

### 3. ENGORDE DE JUVENILES

- 3.1. Manejo de juveniles y densidad de estabulación
- 3.2. Avances en la definición de un pienso específico para la especie; tasas de crecimiento y mortalidad.
- 3.3. Evaluación del crecimiento en tanques y jaulas de engorde adecuados a la especie.

### 4. ESTUDIOS GENÉTICOS

- 4.1. Caracterización de las poblaciones naturales y de los stocks cultivados, de las diferentes áreas.
  - 4.1.1. Estudios moleculares
  - 4.1.2. Estudios citogenéticos
- 4.2. Estudio de la endogamia en las poblaciones cultivadas y en los programas de selección.

### 5. ESTUDIOS PATOLÓGICOS

- 5.1. Estudio y control de patologías de origen bacteriano.
- 5.2. Estudio de la aparición de malformaciones.
- 5.3. Estudios histopatológicos.
- 5.4. Estudios genéticos de las diferentes patologías.

## OBJETIVOS REALIZADOS

Todos excepto:

### 1. REPRODUCCIÓN

1.2.6. Estudio de gametos: características morfológicas de espermatozoides y ovocitos.

### 5. ESTUDIOS PATOLÓGICOS

5.3. Estudios histopatológicos.

## METODOLOGÍA

### 1. REPRODUCCIÓN

En Cantabria se estabularon tres stocks de reproductores de 60 ejemplares cada uno y bajo las mismas condiciones ambientales para ensayar tres dietas diferentes, a) Pienso estándar, b) Pienso estándar + 1500 mg de L-carnitina / Kg de pienso y c) Pienso estándar + 1500 mg de L-carnitina , 40 mg de Asthaxantina y 40 mg de Cantaxanthina / Kg de pienso.

Todos los grupos fueron alimentados una vez al día con una ración del 1.5 % de su peso. La valoración del efecto de las dietas se hizo sobre la viabilidad de las puestas.

Por otra parte, con el fin de obtener puestas con control de fotoperíodo, se establecieron dos grupos de besugos uno con fotoperíodo natural por medio de una fotocélula exterior y otro con fotoperíodo controlado de 7/17 horas D/N, fotoperíodo que se invirtió a 17/7 horas D/N para la estimulación de la maduración, dos meses antes de la puesta.



En Galicia con el fin de estudiar el ciclo reproductivo de ejemplares del medio natural se realizaron durante el período 2001-2003 muestreos cada dos meses en la zona de Aguiño (Ribeira) que completan estudios anteriormente iniciados. No se pudieron realizar los muestreos correspondientes a los meses comprendidos entre noviembre del 2002 y abril del 2003 debido a problemas derivados del vertido del buque Prestige.

Los muestreos se realizaron sobre individuos adultos con un peso medio de todo el período de  $970 \pm 111$ g. Los ejemplares se pesaron (g) y midieron (cm) y se analizó el estado de desarrollo gonadal según la escala establecida por Krug (1986). Además se pesaron el hígado y la gónada de los ejemplares para la obtención de los índices gonadosomático (IGS) y hepatosomático (IHS) utilizando las fórmulas siguientes,

$$\text{IGS (\%)} = (\text{peso de la gónada} / \text{peso total}) \times 100$$

$$\text{IHS(\%)} = (\text{peso del hígado/peso total}) \times 100.$$

Se tomaron muestras del hígado, músculo y gónada de los ejemplares de diferentes sexos y estados de desarrollo, para realizar los análisis bioquímicos posteriores, con el fin de ver si existe una relación entre el grado de desarrollo de los ejemplares y su composición y de obtener patrones de composición bioquímica de ejemplares del medio natural para su comparación con los procedentes de cultivo.

## 2. CULTIVO LARVARIO

En Cantabria se realizaron experimentos de nutrición larvaria utilizando como control una dieta estándar a base de enriquecedores de la casa comercial INVE: DHA Protein Selco para rotíferos y DHA Selco para Artemia. Por otra parte se establecieron diferentes tratamientos añadiendo sobre la dieta estándar diferentes vitaminas y otros compuestos. De esta forma se realizaron los siguientes grupos:

- 1.- 1 mg de ácido fólico/Kg peso vivo larvas (pvl).
- 2.- 300 mg de vitamina E/Kg pvl
- 3.- Dieta estándar (sin tratamiento)
- 4.- 1 mg de ácido fólico+300 mg de vitamina E/Kg pvl
- 5.- 500 mg de vitamina A /Kg pvl
- 6.- 150 mg de L-carnitina /Kg pvl
- 7.- 1 mg de ácido fólico + 300 mg de vitamina E + 500 mg de vitamina A/Kg pvl
- 8.- 150 mg de L-carnitina/Kg de alimento vivo (pav)
- 9.-Protón (INVE) y Profosan (INAGROSA), microencapsulados utilizados como sustitutos de rotíferos, y 150 mg de L-carnitina/Kg de alimento vivo en la fase de Artemia.

El enriquecimiento de las presas se efectuó cuatro horas antes de su utilización y el alimento fue suministrado tres veces al día, renovando el agua después de cada período de alimentación. La densidad del alimento vivo fue en todos los casos de 10 rotíferos/ml y 12 Artemias/ml. Todos los experimentos se llevaron a cabo con sus correspondientes replicados.

En GALICIA se realizaron estudios de crecimiento larvario para lo cual se muestrearon las larvas en talla y peso seco. Para el control del peso seco las larvas se mantuvieron en estufa a una temperatura de 80° C durante 24 horas, siendo pesadas posteriormente en una balanza analítica de precisión 0.1 µg.

Se probaron diferentes microalgas como enriquecedores del alimento vivo. Las algas utilizadas fueron *Isochrysis galbana*, *Tetraselmis suecica* y *Nannochloropsis sp2*. Se realizaron controles de crecimiento de las larvas y se tomaron muestras de larvas para análisis bioquímicos al inicio de la experiencia (D0) y al día 16 de vida (D16) en las pruebas de alimentación con rotífero y a la edad de 41 y 48 días (D41 y D48) en los experimentos de Artemia.

Respecto al proceso de transición de alimento vivo a alimento inerte, los experimentos se realizaron por duplicado en la planta de cultivos del C.O. de Vigo del IEO en tanques cuadrados de 500 litros y consistieron en adelantar la introducción del alimento inerte a día 40 de vida (DA) de las larvas y comparar los resultados obtenidos con el cultivo estándar, en que el destete se realizó al día 50 de vida (DS). Se tomaron muestras para peso seco y análisis bioquímico a días 30, 35, 41 y 50 de vida de las larvas en las sometidas a destete adelantado y a días 50 y 59 en las de destete retrasado.

### 3. ENGORDE DE JUVENILES

En Cantabria se constituyeron seis grupos de 75 ejemplares con un peso medio de  $175 \pm 30$  g.

Se obtuvieron diferentes dietas, añadiendo compuestos sobre la composición del pienso estándar que se cita a continuación:

#### COMPOSICION DEL PIENSO ESTÁNDAR

Proteína	40,80%
Grasa	6,80%
Hidratos de Carbono	8,66%
Humedad	35,39%
Cenizas	8,12%

PREMIX VITAMINICO MINERAL ESTANDAR	
Cantidad añadida: 2g/Kg de pienso	
VITAMINAS	
Vitamina A	10 <sup>6</sup> U.I.
Vitamina E	30 g
Vitamina B1	25 g
Vitamina B2	100 g
Vitamina B6	25 g
Vitamina B12	0,10 g
Vitamina K3	2,50 g
Vitamina C	125 g
Pantotenato cálcico	100 g
Acido Nicotínico	375 g
Acido Fólico	7,50 g
Biotina	0,75 g
Inositol	26 g
Excipiente	100 g
MINERALES	
Bifosfato cálcico	2225 mg
Carbonato cálcico	1000 mg
Carbonato magnésico	900 mg
Sulfato ferroso	500 mg
Cloruro potásico	250 mg
Sulfato de aluminio	1 mg
Sulfato de zinc	20 mg
Sulfato de cobre	5 mg
Sulfato de manganeso	10 mg
Ioduro potásico	1 mg
Cloruro de colina	150 mg
Sulfato de cobalto	5 mg

Se establecieron así las dietas que citan a continuación para los diferentes grupos de peces:

- Dieta 1: 3.1 g de metionina + 5.1 g de lisina + 3.4 g de treonina + 5.4 g de arginina + 3.1 g de cistina + 0.006 g de triptófano.
- Dieta 2: 2.1 g de metionina + 3.4 g de lisina + 2.28 g de treonina + 3.6 g de arginina + 2.1 g de cistina + 0.004 g de triptófano.
- Dieta 3: 2.1 g de metionina + 3.4 g de lisina + 2.28 g de treonina + 3.6 g de arginina + 2.1 g de cistina + 0.004 g de triptófano + 1.5 g de L-carnitina.
- Dieta 4: 2.1 g de metionina + 3.4 g de lisina + 2.28 g de treonina + 3.6 g de arginina + 2.1 g de cistina + 0.004 g de triptófano + 1.5 g de L-carnitina + 1 g de vitamina A + 0.5 g de vitamina C + 0.3 g de vitamina E + 0.001 g de Ácido fólico
- Dieta 5: Pienso estándar
- Dieta 6: 1 g de vitamina A + 0.5 g de vitamina C + 0.3 g de vitamina E + 0.001 g de Ácido fólico.

Las vitaminas fueron añadidas en cantidades por Kg de peso húmedo de pienso estándar.

Los aminoácidos fueron añadidos en cantidades por 16g de N proteínico, sobre el pienso estándar. Los contenidos de los aminoácidos esenciales en el pienso estándar eran 1.03% de metionina, 0.15% de cistina, 2.37% de lisina, 1.44% de treonina, 2.40% de arginina y 0.26% de triptófano.

Todos los grupos fueron alimentados *ad libitum* dos veces al día.

#### 4. ESTUDIOS GENÉTICOS

4.1. Caracterización de las poblaciones naturales y de los stocks cultivados de las diferentes áreas.

#### 4.1.1. Marcadores moleculares (microsatélites).

##### *Puesta a punta de los marcadores moleculares (loci microsatélites).*

Como paso inicial a las propuestas presentadas a inicio del proyecto, era necesario encontrar herramientas moleculares específicas de la especie en estudio, *Pagellus bogaraveo* o besugo. A fecha de inicio de dicho proyecto no existían referencias bibliográficas a ningún marcador molecular tipo locus microsatélite, por lo que era necesario lograr la identificación y aislamiento de tal tipo de secuencias.

A partir de ADN extraído mediante balances de fenol: cloroformo, se creó una librería génica, desde la cual obtuvimos 42 regiones de ADN con presencia de secuencias microsatélites. Se diseñaron seis pares de iniciadores para cada una de las secuencias de tal manera que se pudiesen obtener amplificaciones de tamaños diferentes que permitieran el análisis conjunto de varios loci sin solapamiento de los fragmentos amplificados. Se seleccionó un par de iniciadores para cada una de 15 secuencias microsatélite, con el fin de obtener 15 loci.

Para optimizar las condiciones de amplificación se extrajo ADN de cuatro individuos a partir de una pequeña porción de tejido mediante el uso de 400 µl de resina Chelex 100 (Biorad) y 10 µl de proteinasa K (Walsh et al. 1991). Se combinaron todas las variaciones posibles de parámetros como: concentración de cloruro de magnesio (MgCl<sub>2</sub>) desde 0,5 mM a 4 mM, volumen de ADN desde 0,5 a 2,5 µl, 0,5 a 2 U de Taq polimerasa, temperatura de hibridación desde 50 a 65 °C y número de ciclos de amplificación de 30 a 45. El resto de condiciones se mantuvieron constantes y en exceso (dNTPs: 200 µM, iniciadores: 2 ng/µl). El volumen final de reacción para todos los casos era de 20 µl.

La lectura de las amplificaciones positivas se realizó en geles de poliacrilamida desnaturalizante (6%) y tinción de plata (Promega Silver Sequence ADN Staining). Posteriormente se utilizó un secuenciador automático OpenGene Automated ADN sequencing system (Visible Genetics, Inc.).

Aunque la optimización de las secuencias microsatélites se desarrolló en fases sucesivas, en el presente contamos con una batería de 12 loci microsatélites cuyas condiciones de amplificación permiten su análisis.

#### *Muestras analizadas*

Uno de los objetivos del proyecto era calibrar la variabilidad presente en muestras naturales y la posible variación de ésta cuando individuos de dichas muestras se introducen en programas de cultivo en piscifactoría.

A partir de siete loci microsatélites se analizaron muestras de individuos capturados en tres regiones de la costa española y cuyo destino es formar parte de lotes de cultivo en piscifactoría:

Atlántico: 40 individuos, capturada en Galicia.

Mediterráneo: 43 individuos, capturada en Alicante.

Cantábrico: 26 individuos, capturada en Cantabria.

Paralelamente se analizó un lote, Cautividad Galicia, compuesto por 76 individuos nacidos en piscifactoría a partir de un lote reproductor de individuos naturales provenientes de la costa atlántica de Galicia.

Por último se analizaron 3 lotes de reproductores mantenidos en cautividad:

R1: 34 individuos

R2: 35 individuos

R5: 52 individuos

A partir de ADN extraído mediante balances de fenol: cloroformo, se creó una librería génica, desde la cual se obtuvieron 42 regiones de ADN con presencia de secuencias microsatélites. Se diseñaron seis pares de iniciadores para cada una de las secuencias de tal manera que se pudiesen obtener amplificaciones de tamaños diferentes que permitieran el análisis conjunto de varios loci sin solapamiento de los fragmentos amplificados. Se seleccionó un par de iniciadores para cada una de 15 secuencias microsatélite, con el fin de obtener 15 loci.

Aunque la optimización de las secuencias microsatélites se desarrolló en fases sucesivas, en el presente se cuenta con una batería de 12 loci microsatélites cuyas condiciones de amplificación permiten su análisis.

#### 4.1.2. Estudios citogenéticos.

##### *Obtención de cromosomas*

Para la obtención de preparaciones cromosómicas que permitieran el análisis citogenético, se han empleado diferentes técnicas dependiendo de la disponibilidad de los diferentes estadios de desarrollo de la especie analizada. Se han comparado diferentes medios de cultivo celulares y se han optimizado los tiempos y temperaturas empleadas.

Así, se han obtenido cromosomas a partir de:

- Individuos juveniles. Desarrollando la técnica de cultivos cortos a partir de células de tejido renal.

Para ello se sacrifica el animal y se le extrae el riñón, se trocea y se introduce en un homogenizador de tejidos que contiene 1 ml de medio de cultivo RPMI 1640 (modificación Dutch).



Se macera el material y la suspensión se pasa ahora a un tubo que contiene 7 ml del medio de cultivo empleado: 80% de medio RPMI 1640 (modificación Dutch) y 20% de suero bovino fetal. Inmediatamente se añaden 7 gotas de una solución de colchicina 0.04% en solución salina de Hank. El cultivo se incuba ahora a 20°C durante 4 horas.

Transcurridas las 4 horas, se centrifuga el cultivo a 1000 rpm durante 10 minutos. Se retira el sobrenadante, se resuspenden las células y se le añaden 7 ml de solución CIK 0.075M, prolongando el choque hipotónico durante 45-60 minutos. Transcurrido este tiempo se realiza una prefijación para evitar la aglutinación mediante la adición de 3 ó 4 gotas de fijador Carnoy modificado (metanol:ácido acético, 3:1). Seguidamente se centrifuga a 1000 rpm durante 10 minutos. Se elimina ahora el sobrenadante, se resuspende el sedimento y se procede a la fijación del mismo con Carnoy modificado, fijación que durará 45 minutos y se desarrollará a 4°C. Transcurrido este tiempo, se centrifuga a 1000 rpm durante 10 minutos, pasados los cuales se decanta el sobrenadante y se añade fijador fresco. Este paso se repite por tercera y última vez. Tras la última centrifugación se elimina el sobrenadante y se resuspende el material en 1 ml de fijador fresco, mezclándose bien con una pipeta Pasteur.

Se procede a la obtención de las extensiones cromosómicas a partir de la suspensión celular obtenida. Para ello, con una Pasteur y desde una cierta altura (un metro aproximadamente) se hacen caer de 3 a 5 gotas de la suspensión a un portaobjetos que previamente ha sido desengrasado y lavado.

- Individuos adultos, mediante el cultivo de linfocitos obtenidos tras la extracción de sangre.

La extracción se realiza con el animal anestesiado y pinchando en la vena caudal con una jeringuilla estéril heparinizada. La sangre extraída (2-3 ml) se mezcla con solución salina de Hank en proporción 1:1.

Esta sangre diluida es centrifugada dos veces a 500 rpm durante 5 minutos a 4°C, extrayendo, en cada centrifugado el plasma rico en linfocitos. Los linfocitos son transferidos a un tubo estéril con 1 ml de medio RPMI 1640 (modificación Dutch) y centrifugados durante 10 minutos a 1000 rpm a 4°C. El suero es eliminado y las células nuevamente resuspendidas con 4 ml de Hank, centrifugando posteriormente a 1000 rpm, 4°C durante 10 minutos. El sedimento celular es ahora resuspendido en 7ml de medio de cultivo e incubado a 20°C durante 4 horas en presencia de colchicina. Tras el choque hipotónico y posterior fijación, se realizaron las extensiones. El procedimiento es el mismo que se emplea en el tejido renal.

- Estadios larvarios tras la eclosión del huevo.

Las larvas fueron mantenidas durante 4-6 horas en un agua salina con colchicina al 0.01-0.02%. Transcurrido este tiempo, las larvas son dispuestas en CIK 0,4% durante 45-60 minutos. Tras este choque hipotónico las larvas se fijan en Carnoy (metanol: ácido acético en proporciones 3:1) durante 30 minutos a 4°C. Se elimina totalmente el fijador y se sitúan las larvas en un tubo cónico con 15 µl de ácido acético al 70%. Con una micropipeta se agita el material hasta formar una suspensión celular. Se deposita una gota sobre un portaobjetos previamente calentado a 60°C, recogiendo la gota nuevamente de forma rápida quedando en el portaobjetos las células extendidas.

Estas preparaciones cromosómicas fueron posteriormente teñidas con diferentes tinciones (giemsa, bandeó C, tinción con plata, yoduro de propidio...), que sirvieran como base para el estudio del cariotipo.

#### *Obtención de material para extracción de ADN genómico*

El primer paso consistió en obtener ADN a partir de diferentes tejidos como son el hígado, el músculo y la sangre siguiendo el método de Sambrook et al. (1989) en el caso de hígado y músculo o utilizando el kit UltraClean™ DNA Blood Isolation (Rafer) para sangre. Las muestras fueron proporcionadas por el

centro de investigación El Toruño. En concreto, la extracción ha sido realizada de diferentes individuos de voraz, breca, garapello y aligote.

#### *Aislamiento del ADN repetido*

Se ha desarrollado una estrategia rápida de aislamiento de este tipo de secuencias mediante PCR. Los cebadores diseñados, fueron:

Para el ADN satélite EcoRI:

CEN1: 5'-AAATTGAGCGTTTCAGAGCGAG-3'

CEN2: 5'-AGCTTTTTTAACTCAAATACAG-3'

Para el ADN satélite Dral:

DRA1: 5'-TGTGTCTCGTTCAGCCAGTATA-3'

DRA2: 5'-CCATTGGATTCTGGGTGGAATTT-3'.

La cantidad de ADN utilizada en las amplificaciones mediante PCR de las diferentes especies fue de 25-100 ng. La PCR se llevó a cabo en un volumen final de 50 µl con los siguientes volúmenes de reactivos: 5 µl del buffer de PCR (10 mM Tris-ClH, pH=8.3; 5 mM NH<sub>4</sub>C; 50 mM KCl), 0.2 mM de cada dNTPs, 1 µl de cada cebador (100 ng/µ) y 0.5 U Taq polimerasa. La amplificación consistió en 35 ciclos 94°C durante 1 minuto, 54°C durante 1 minuto y 72°C durante 1 minuto.

Los fragmentos amplificados fueron escindidos del gel y purificados. Una vez confirmada la naturaleza de la banda amplificada por PCR mediante Southern-blot, las unidades de repetición fueron ligadas al vector de clonación pGEM-T Easy y clonadas en células competentes de *E. coli* JM109. Los clones recombinantes conteniendo las unidades de repetición fueron secuenciados.

4.2. Estudio de la endogamia en las poblaciones cultivada y en los programas de selección.

### *Generación de descendencias simuladas.*

En un primer momento surge la necesidad de evaluar la capacidad de los loci microsatélites para resolver los problemas a los que nos enfrentamos al intentar realizar un control sobre los individuos en cultivo de forma que se evite en lo posible el aumento de endogamia. El programa Probmax (Danzmann, 1997), permite generar, a partir de los genotipos conocidos de un lote de reproductores, genotipos de descendientes en función del cruzamiento que se le indique. Entre las opciones podemos escoger el número de descendientes por cruzamiento, el número de cruzamientos totales y la participación de los parentales en los diferentes cruzamientos. La elección de los individuos que participan en los cruzamientos se realizó totalmente al azar, ante la ausencia de datos sobre el sexo de los individuos en cultivo (debido a la peculiar biología de esta especie). La mitad de dichos individuos seleccionados fue considerada como hembras mientras el resto lo fue como machos. Así se seleccionaron 10 individuos de cada uno de los cuatro lotes de reproductores disponibles (Atlántico, R1, R2 y R5), y se cruzaron 5 por 5 (25 cruzamientos), obteniendo 10 descendientes por cruzamiento, en total, 250 descendientes.

### *Identificación de Parentales*

El programa Cervus 2.0 permite inferir la pareja parental de un determinado individuo entre un grupo de reproductores mediante la comparación de los genotipos analizados. Paralelamente ofrece una serie de parámetros de variabilidad, de los cuales el más relevante, en el aspecto que nos ocupa, es el PIC, y que indica indirectamente la cantidad de alelos existente y como estos se disponen en la muestra.

El PIC se ha documentado como un parámetro de gran utilidad a la hora de seleccionar loci microsatélites a utilizar en procesos de identificación de parentales. Así, se considera que en dichos trabajos se debe trabajar con loci que presenten un  $PIC \geq 0,7$ .

Por otro lado, y aplicado sobre las muestras analizadas, Cervus es capaz, una vez conocidas las frecuencias alélicas de un lote de individuos, de realizar una primera simulación con un número opcional de ciclos reiterativos con el fin de observar una evaluación de la eficacia de los loci escogidos.

Se enfrentaron los descendientes generados mediante Probmax con sus respectivos lotes de reproductores. Cervus calcula inicialmente el parental más probable, y en una segunda asignación, busca el parental que complemente la pareja, de forma que el resultado sea la pareja de parentales con mayor probabilidad para cada uno de los descendientes.

#### *Relaciones de parentesco*

Relatedness 5.0.6 (Queller & Goodnight, 1989) es un programa que permite evaluar el grado de similitud genética entre individuos de una muestra, lo que resulta especialmente útil cuando el pedigrí de la misma es desconocido y buscamos limitar el aumento de endogamia a través de las sucesivas generaciones en cultivo.

Se evaluó la capacidad del parámetro  $r$ , calculado al comparar los genotipos de dos individuos entre sí, para discriminar individuos no relacionados, medio hermanos y hermanos completos. Para ello se recurrió a los descendientes simulados por ordenador, cuyo parentesco es conocido.

Igualmente se quería obtener un criterio fiable que permitiese seleccionar individuos realmente no emparentados con el fin de evitar el aumento de endogamia en futuras generaciones.

## 5. ESTUDIOS PATOLÓGICOS

En Cantabria se utilizaron los métodos habituales para el diagnóstico bacteriano y los antibiogramas correspondientes a las patologías presentadas y a modo de prevención se realizaron análisis microbiológicos de los piensos.

En Galicia en todos los muestreos realizados se tomaron muestras de los peces para control bacteriano. Las muestras tomadas fueron analizadas en la Universidad de Santiago. También se enviaron muestras siempre que hubo algún problema sanitario.

### *TÉCNICAS PARA ANÁLISIS BIOQUÍMICOS*

En Cantabria:

La determinación cuantitativa de proteína (cantidad de nitrógeno total) se realizó por el método de Kjendhal y la humedad por el método gravimétrico con evaporación a 102°C.

Los lípidos fueron determinados mediante gravimetría con la extracción previa con hidrólisis de hexano.

Los hidratos de carbono se analizaron con una extracción previa con etanol y reactivo de Carrez, valorando el azúcar por el método de Luff-Schoorl antes y después de su inversión.

Los aminoácidos se analizaron por cromatografía de gases.

En Galicia:

Todos los análisis bioquímicos, tanto de los alimentos suministrados como de los huevos, larvas y de los ejemplares de mayor tamaño, se realizaron en el CIMA de Corón de la Xunta de Galicia.

Las proteínas se analizaron por el método de Bradford (1976). Los lípidos totales fueron extraídos con cloroformo-metanol (2:1) esencialmente por el método de Blight & Dyer (1959) modificado por Fernández Reiriz et al (1989) realizándose la determinación cuantitativa de los lípidos gravimétricamente en balanza analítica de precisión 0.001 mg.

Las clases de lípidos fueron separados por Cromatografía en Capa Fina (TLC) según Freeman & West (1966) y Bitman & Wood (1982) y se cuantificaron por densitometría.

Los ácidos grasos, previa transesterificación y metilación a sus ésteres metílicos usando el método de lepage & roy (1986), se analizaron por cromatografía de gases (cg) realizándose la determinación cuantitativa mediante la adición a las muestras, de un patrón interno y utilizando un patrón cuantitativo comercial (larodan).

## RESULTADOS

A continuación se muestran los resultados en el orden establecido para los objetivos generales del Proyecto.

### 1. Reproducción:

#### 1.1. Estudios de comportamiento en el medio natural

##### 1.1.1. Seguimiento del desarrollo gonadal: determinación de la época de puesta natural.

En los tres años estudiados los resultados nos indican que el período de puesta natural abarca desde los meses de febrero a mayo y de un total de 276 ejemplares muestreados, el 56,5% son hembras, el 37,7% son machos y el 6,1% hermafroditas.

De los ejemplares muestreados, el mayor porcentaje de individuos se corresponde con el estado postdesove (VI) al que pertenecen el 39,7% de las hembras y el 37,5% de los machos, seguidos por el estado de madurez (III-IV) con un 34,6% de hembras y un 22% de machos. En estado de inmadurez ó inicio de la maduración están el 13,5% de las hembras y el 23,07% de los machos y próximos al desove (V) el 12,18% de las hembras y el 18,27% de los machos. En las hembras inmaduras ó en inicio de la maduración el IGS (Índice gonadosomático) presenta un valor medio del 1,16%, mientras que en hembras maduras y en estado de predesove está alrededor del 6%. En el período de desove, el IGS medio de las hembras es del 9,75%, llegando a alcanzar en algunos ejemplares el peso de la gónada valores próximos al 19% del peso corporal. En el periodo postdesove se produce una fuerte bajada, con un valor medio del 1,05%. En los machos, los IGS varían entre un valor medio de 0,66% en machos inmaduros ó en inicio de la maduración hasta 5,05% en individuos maduros pudiendo alcanzar valores de hasta 8,27 % en estado de predesove. En el período de desove presentan valores medios de 4,12% y tras el desove los IGS bajan, con un valor medio del 0,35% (Tabla I).



El índice hepatosomático (IHS) alcanza valores medios en las hembras entre 1,17 y 1,30% y en los machos entre 0,68 y 1,22% observándose un ligero descenso, es decir disminución del tamaño del hígado cuando los individuos están maduros. En las hembras, se alcanzan valores ligeramente más altos de los IHS cuando están en período de desove (1,38%) (Tabla I)

Tabla I. Índice gonadosomático (IGS) y hepatosomático (IHS) en los diferentes estados de desarrollo

Estados de desarrollo	Hembras		Machos	
	IGS (%)	IHS (%)	IGS (%)	IHS (%)
Inmaduro (I)	1.16±0.40	1.30±0.28	0.66±0.59	1.12±0.28
Inicio maduración (II)				
Maduro (III-IV)	5.92±3.68	1.26±0.28	5.05±1.68	0.75±0.24
Desove (V)	9.75±3.80	1.38±0.33	4.12±3.36	0.68±1.19
Postdesove (VI)	1.05±0.56	1.17±0.34	0.35±0.40	1.22±0.27

Los análisis de composición bioquímica muestran la relación existente entre el contenido lipídico de las gónadas femeninas y el grado de desarrollo de los ejemplares, con una gran acumulación de lípidos fundamentalmente triglicéridos durante el período de desove; por el contrario el contenido de lípidos en el hígado está en relación inversa al grado de desarrollo gonadal de machos y hembras (Fig.1a y b).

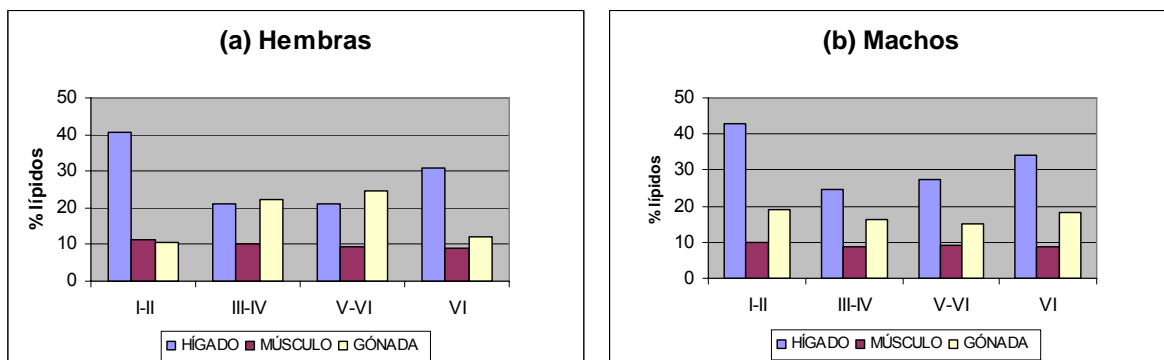


Fig.1 Evolución del contenido lipídico en el hígado, músculo y gónada de hembras (a) y de machos (b) de besugo en los diferentes estados de desarrollo.

Además se confirmaron las diferencias existentes en la acumulación de grasa perivisceral y en la composición lipídica entre los ejemplares procedentes del medio natural y los de cultivo intensivo, resultando estos últimos con un acumulo de grasa perivisceral mucho mayor en hígado y músculo que los del medio natural (Fig.2 a y b).

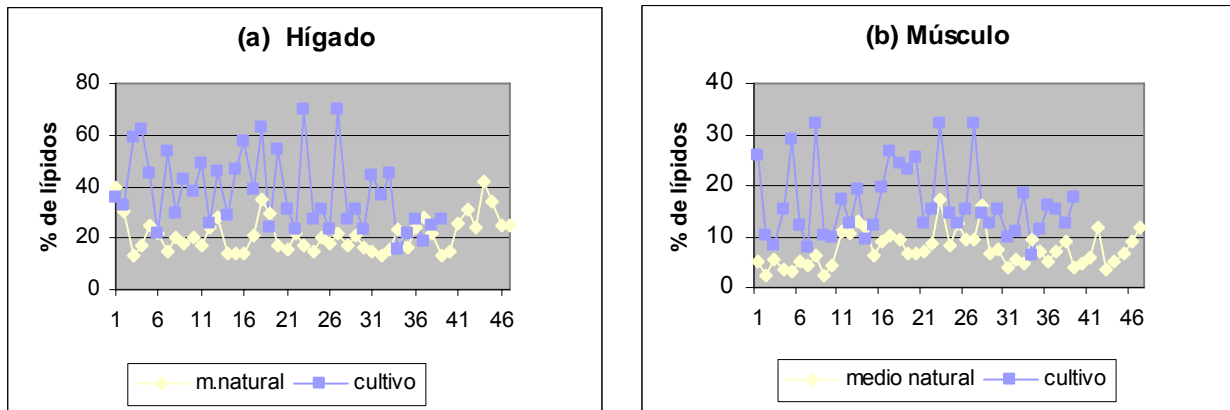


Fig. 2. Composición en lípidos totales en hígado (a) y músculo (b) en ejemplares del medio natural y de cultivo

## 1.2. Puesta a punto de stocks de reproductores

### 1.2.1. Captura y transporte de reproductores.

En Galicia:

Los lotes de reproductores de besugo procedentes del medio natural y de cultivo intensivo han estado estabulados desde noviembre del año 1998 y hasta julio del 2001 en las instalaciones de Valdoviño (A Coruña) de la Empresa Luso- Hispana de Acuicultura.

En julio del año 2001, los reproductores procedentes del medio natural pertenecientes al IEO de Vigo y de cultivo intensivo del IEO y del CIMA se trasladaron a las instalaciones del C.O. de Vigo del IEO y fueron estabulados separadamente en dos tanques de 110 m<sup>3</sup> de volumen.

Mediante un acuerdo entre la Consellería de Pesca y la empresa Luso-Hispana de Acuicultura se decidió que los reproductores procedentes del medio natural pertenecientes al CIMA permaneciesen por un período de dos años más en las instalaciones de la empresa Luso-Hispana de Acuicultura.

Durante el año 2003 se ha producido una mortandad considerable en los stocks de reproductores estabulados en el IEO de Vigo, por ello, se han completado los lotes de reproductores existentes tanto el stock del medio natural con ejemplares procedentes de la pesca como el de cultivo con los ejemplares procedentes de engorde de tanques y jaulas. En la actualidad se dispone de los siguientes lotes:

- S-1 compuesto de 192 ejemplares nacidos en cautividad.
- S-2 compuestos por 82 ejemplares procedente de pescas realizadas en el medio natural.

Ambos lotes están estabulados en dos tanques de 110 m<sup>3</sup> en el CO de Vigo del IEO.

- S-3 compuesto por 40 ejemplares procedente de pescas realizadas en el medio natural. Este lote está estabulado en un tanque de 130 m<sup>3</sup> en las instalaciones de la empresa Luso-Hispana de Acuicultura en Valdoviño (A Coruña).

Todos los ejemplares están marcados individualmente con microchips.

#### 1.2.2. Manejo y tratamientos preventivos.

Los ejemplares adultos de besugo son delicados por lo que se trató durante este proyecto disminuir al máximo el manejo de los mismos. Se realizó una sola vez, después de la época de las puestas y en estado de reposo, un muestreo de los mismos para conocer su estado, talla y peso y la recogida de la muestra de la aleta caudal para su análisis genético previa anestesia con fenoxietanol.

Los ejemplares desde los 2 g hasta 500 g fueron muestreados y manejados sin anestesia.

Se administró un tratamiento preventivo mensual a base de formol y oxitetraciclina en un baño a todos los lotes de peces excepto a los reproductores que solamente se les trató en época de reposo.

### 1.2.3. Diseño de los tanques de reproductores.

En Galicia se había observado que los besugos no ponían en tanques menores de 35 m<sup>3</sup>, por lo que se realizaron obras para construir unos tanques adecuados para esta especie y así conseguir optimizar la obtención de puestas. Así los peces estuvieron estabulados en la empresa Luso Hispano de Acuicultura y el primer año las puestas naturales se trataron en Valdoviño. De esta forma se pudo ver que el tamaño de los tanques y su profundidad en concreto, está relacionado con el buen estado de los peces y con la obtención de huevos.

En la actualidad los reproductores se encuentran estabulados en tanques de 110 m<sup>3</sup> en una densidad aproximada de 1.3 kg/m<sup>3</sup>. La relación macho : hembra en ningún momento pudo ser controlada puesto que los peces no fueron manejados en la época de puesta que es cuando podría ser conocida.

### 1.2.4. Estudio de la alimentación de reproductores. Influencia sobre la calidad de puesta y el desarrollo embrionario.

En Cantabria de los grupos de reproductores alimentados con diferentes dietas (a, b y c) mencionados anteriormente, el que dio mejores resultados en cuanto a mejor viabilidad de las puestas fue el grupo b al que se le añadió L-Carnitina en la dieta. Las puestas obtenidas de este grupo presentaron una tasa de fecundación del 74-83 %. El porcentaje de eclosión de larvas fue de 68-80% y la viabilidad en la reabsorción del saco vitelino del 50-66%. Estos datos obtenidos fueron inferiores en el resto de los grupos, siendo el más bajo, el grupo estándar.

En Galicia los adultos de besugo estuvieron alimentados durante el período de este proyecto con un pienso comercial “REPRO” para reproductores de la casa TROUW. En la época previa a la puesta se complementó la comida con calamar y mejillón.

#### 1.2.5. Obtención de puestas naturales e inducidas.

En Galicia todas las puestas obtenidas fueron espontáneas y debido a las circunstancias especiales en que se encontraron los reproductores no se pudieron realizar experimentos relativos al control de las puestas. En la Fig. 3 se muestra la evolución desde el año 1999 al 2002 del nº de huevos viables, no viables y larvas obtenidas del stock de reproductores del medio natural.

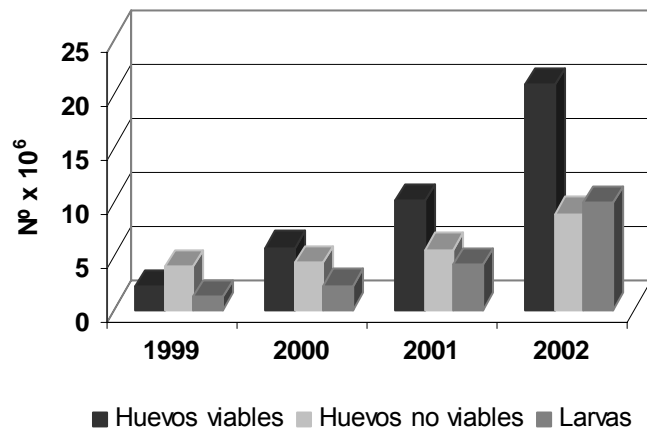


Fig. 3. Evolución del nº de huevos viables, no viables y nº de larvas obtenido en el período 1999-2002.

Durante el año 2001 se obtuvieron 10 millones de huevos viables procedentes del stock de reproductores del medio natural. Durante el año 2002 se obtuvieron un total de 13,97 millones de huevos del lote S-2 de los que fueron viables el 62,2% y 15,80 millones del lote S-3, con un 77% de viables. El porcentaje de eclosión fue del 40% y 47,7% en los huevos procedentes de las puestas de los lotes S-2 y S-3 respectivamente. Se obtuvieron un total de 4 millones de larvas de las puestas del lote S-2 y 5,8 millones del lote S-3.

Durante el año 2003, no se obtuvieron puestas del lote S-2 probablemente debido al stress provocado por las condiciones de mantenimiento a que tuvieron que ser sometidos los reproductores a causa del accidente del Prestige, que pudo provocar una regresión en las gónadas e inhibir la maduración. No obstante, se obtuvieron las primeras puestas aunque de escaso volumen de los reproductores nacidos en cautividad (S-1). Con respecto al lote S-3, se obtuvieron un total de 17,6 millones de huevos flotantes pero no se presentan los datos de número de huevos no viables ni de larvas porque la mayor parte de las puestas fueron desechadas por la empresa en donde se encuentra ubicado ese lote.

1.2.7. Incubación: estudio del desarrollo embrionario, tasas fecundación y de eclosión.

En Galicia se ha obtenido desde el año 2001 un porcentaje de fecundación de los huevos de alrededor de un 65 %. El porcentaje de eclosión de los huevos viables fue entre un 41,1 y 47,7 % y se obtuvieron en el año 2001, 4 millones de larvas y en el 2002, 9.8 millones.

## 2. Cultivo larvario.

2.1. Optimización de la técnica de cultivo larvario: definición del manejo de los tanques de cultivo larvario.

2.1.1. En Cantabria se utilizó la técnica de cultivo de “agua clara” , es decir sin fitoplancton en el medio de cultivo y utilizando como enriquecedores del alimento vivo los productos comerciales citados.

2.1.2. En Galicia el sistema de cultivo larvario utilizado fue el de “agua verde”, introduciendo *Isochrysis galbana* combinada con un alga verde, *Nannochloropsis* sp.2, en el medio de cultivo. Las larvas se trasvasaron desde los tanques de incubación en el momento anterior al consumo total del saco

vitelino, antes de la apertura de la boca y fueron sembradas en los tanques de cultivo larvario a una densidad aproximada de 10 larvas por litro.

El medio de cultivo fue renovado desde el 6º día de cultivo en un 30% de su totalidad, aumentando el 10%/día hasta el día 30 en que se abrió el circuito durante 5 horas (150%), hasta el comienzo del destete en que se mantiene el circuito abierto 24 horas al día.

El agua de mar utilizada se filtró por una micra y su temperatura fue la misma que la de incubación ( $14\pm 1$  °C), y ésta fue calentada gradualmente hasta  $19\pm 1$  °C manteniendo esta temperatura durante todo el cultivo.

La intensidad de luz fue de 2000 lux en superficie, con fotoperíodo continuado de 24 horas.

Se suministró a los tanques una suave aireación suficiente para conseguir, además de una buena oxigenación del agua, una distribución homogénea tanto de las larvas como del fitoplancton añadido. Además, en cada tanque fueron instalados limpiadores de superficie cuya misión consiste en la concentración de partículas superficiales por medio de aire a presión.

## 2.2. Mejora de la secuencia alimentaria con presas vivas.

En Galicia los mejores resultados se obtuvieron siguiendo la secuencia de alimentación a base de rotífero (desde la siembra hasta 35 días de vida), nauplios de Artemia (desde el día 30 hasta el 35) y posteriormente Artemia de 24 y 48 horas (desde los 35 hasta los 50 días), comenzando entonces la introducción del alimento inerte hasta que a la edad de 60 días se alimentan solamente con pienso seco.

El índice de supervivencia larvaria osciló entre el 20 y el 40% a la edad de 60 días de las larvas ya en fase de alimentación inerte.

2.3. Estudio de los requerimientos nutritivos de las larvas. Análisis de la composición bioquímica de presas enriquecidas y larvas.

2.3.1. Cantabria. El análisis de los datos de supervivencia obtenidos en los experimentos de nutrición muestra que existen diferencias significativas entre los diferentes tratamientos. Los mejores resultados fueron obtenidos en los grupos de larvas 6 y 8, en los que se había añadido L-Carnitina sobre la dieta estándar, y muy similar es a los del tratamiento 4 en los que se les suministró ácido fólico y vitamina E.

2.3.2. Galicia. Las larvas recién eclosionadas tienen un peso seco medio de 65,4 ug y una talla de 4,04 mm. A la edad de 16 días, las larvas alimentadas con Rotífero+Isochrysis presentan un peso seco superior (304,3 µg) a las alimentadas con rotífero con Tetraselmis (219 µg) ó con Nannochloropsis (258 µg). Los valores de proteínas oscilan entre el 47% en larvas recién eclosionadas y el 49, 48 y 53% en larvas alimentadas con rotífero enriquecido con Isochrysis, Tetraselmis y Nannochloropsis, respectivamente. Existe un gran consumo lipídico a lo largo del período larvario, descendiendo en los primeros 15 días de vida del 26% a valores próximos al 15%, no observándose diferencias significativas entre las 3 microalgas como enriquecedores.

El contenido en las diferentes clases de lípidos en larvas recién eclosionadas y con 16 días de vida alimentadas con rotífero enriquecido con las tres microalgas mencionadas se muestra en la Tabla II.



Tabla II. Clases de lípidos (% de lípidos totales) en larvas de besugo a la edad de 0 y 16 días alimentadas con las diferentes microalgas.

Edad (días)	E + C	TAG	ÁCIDOS	ESTEROLES	FOSFOLÍP
0	7.35	70.13	5.99	3.04	13.50
16 (Iso)	0.00	29.32	6.17	10.13	36.73
16 (Tetra)	44.04	0.00	11.16	13.08	31.72
16 (Nanno)	2.68	0.00	27.90	17.49	51.93

En cuanto a la movilización de las diferentes clases de lípidos en este período es de destacar que los triglicéridos, descienden desde el 70% de los lípidos totales, en larvas recién eclosionadas al 29% en las larvas alimentadas con rotífero enriquecido con *Isochrysis* y se consumen totalmente en las larvas de besugo de 16 días de vida alimentadas con rotífero enriquecido con las otras dos microalgas mencionadas (*Tetraselmis* y *Nannochloropsis*). El contenido en fosfolípidos es más alto en larvas alimentadas con rotífero enriquecido con *Nannochloropsis*, (52% de los lípidos totales) frente a las alimentadas con rotífero enriquecido con *Isochrysis*, (37%) y con *Tetraselmis*, (32%). Esto se corresponde con el contenido más alto en esta clase de lípidos cuando el rotífero se enriquece con *Nannochloropsis* (33%) respecto a cuando se utilizan las otras dos microalgas.

En la Tabla III se muestra el contenido de los diferentes grupos de ácidos grasos y del ácido eicosapentanoico 20:5 (n-3) y docosahexanoico 22:6 (n-3).

El contenido en ácidos grasos poliinsaturados (PUFA) desciende desde las larvas recién eclosionadas (día 0) a larvas de 16 días de vida alimentadas con rotífero enriquecido con *Isochrysis* y *Nannochloropsis* e inferiores en larvas alimentadas con rotífero enriquecido con *Tetraselmis*. Dado que los PUFA W3 son los mayoritarios dentro de los poliinsaturados su descenso en los primeros 16 días de vida es claramente patente, variando también según sea la microalga utilizada como enriquecedor del rotífero. Es de destacar que en el período de alimentación con rotífero se dan diferencias significativas en el

contenido del ácido graso docosahexanoico, 22:6 (n-3), de gran importancia en el metabolismo de peces, entre las larvas alimentadas con Rotífero+Isochrysis (15.8% del total ) frente al 6,9 y 6,2% obtenido en larvas con Rotífero+Tetraselmis y Rotífero+Nannochloropsis, respectivamente. El contenido en 20:5 (n-3) supone por el contrario el 12 y 10% del total de ácidos grasos en estas últimas frente al 2% de los ácidos grasos totales en larvas de 16 días alimentadas con rotífero enriquecido con Isochrysis.

Tabla III. Ácidos grasos (% del total) en larvas de besugo a la edad de 0 y 16 días alimentadas con las diferentes microalgas.

Edad (días)	PUFA	Saturad	Monoins	$\Sigma$ W3	$\Sigma$ W6	W3/W6	20:5(n-3)	22:6(n-3)
0	38.92	28.04	26.74	32.74	5.57	5.88	6.86	22.55
16 (Iso)	36.63	33.97	20.30	22.05	13.11	1.68	2.34	15.79
16 (Tetra)	33.57	34.97	21.16	25.81	6.52	3.96	9.84	6.86
16 (Nanno)	37.73	35.98	18.29	27.29	8.42	3.24	11.71	6.21

En la fase de alimentación con Artemia las larvas alimentadas con Artemia enriquecida con Isochrysis (A+Iso) presentan a la edad de 47 días, un peso seco medio de 7,86 mg, superior al obtenido en las alimentadas con Artemia enriquecida con Tetraselmis (A+Tetra) que es de 5,67 mg y con Nannochloropsis (A+Nanno) con 6,44 mg.

En cuanto a la composición bioquímica, las proteínas varían en los primeros 40 días de vida de las larvas entre el 46 y el 48% y se produce un descenso del día 40 al 47 de vida de las larvas. Al finalizar el período de consumo de Artemia (día 47 de vida), el contenido en proteínas es más alto en las larvas alimentadas con A+Iso (43% del peso seco) que en las alimentadas con A+Tetra y A+Nano, 38 y 39% respectivamente.

De forma similar que en el experimento en la fase rotífero, se manifiesta el gran consumo lipídico existente durante el período larvario, desde el 26% en larvas con 2 días de vida a valores del 17 y 16,5% de lípidos totales a días 30 y 40 de vida. Este consumo se corresponde con una disminución en los lípidos de reserva, ésteres+ceras (E+C) y triglicéridos (TAG), desde 26 % en el día 2 de vida a valores de 4.3 y 10.1 % en el día 40 respectivamente (Tabla IV).

Tabla IV. Clases de lípidos (% de los lípidos totales) en larvas de besugo

Edad (días)	<b>E + C</b>	<b>TAG</b>	<b>ÁCIDOS</b>	<b>ESTEROLES</b>	<b>FOSFOLÍP</b>
2	26.39	25.99	1.88	5.25	28.74
30	0.41	15.84	5.67	7.61	31.68
40	4.27	10.15	7.11	6.41	34.27
47 (Iso)	3.32	23.24	6.86	5.32	36.57
47 (Tetra)	3.23	26.98	5.58	4.67	30.67
47 (Nanno)	2.47	29.10	10.56	6.33	35.82

En cuanto a ácidos grasos (Tabla V), los ácidos grasos poliinsaturados (PUFA) descienden durante todo el período larvario. No existen diferencias significativas entre los valores de PUFA de las larvas alimentadas con Artemia enriquecida con las tres microalgas ensayadas, que alcanzan valores de aproximadamente un 30% de los ácidos grasos totales a la edad de 47 días. Los ácidos grasos monoinsaturados se incrementan en las larvas durante el período de alimentación con Artemia. Ello se debe a la gran cantidad de estos ácidos grasos presentes en la Artemia, que suponen entre el 35 y el 38% de los ácidos grasos totales. El ácido eicosapentanoico, 20:5 (n-3), aumenta también en las larvas durante este período. La tendencia contraria, aunque mucho menos acusada que en la fase de alimentación con rotífero la presenta el ácido docosahexaenoico, 22:6(n-3), que disminuyen desde 23.7% hasta 12.9% y 2.48% el día 30 y 40 de vida de las larvas y que a día 47 de vida decrecen hasta 1,5 y 1,4 % en las larvas alimentadas con A+Iso y A+Nano y a 0.92% en las alimentadas con A+Tetra.

Tabla V. Ácidos grasos (% del total) en larvas de besugo

Edad (días)	PUFA	Saturad	Monoins	$\Sigma$ W3	$\Sigma$ W6	W3/W6	20:5(n-3)	22:6(n-3)
2	40.04	27.71	26,41	33,89	5,55	6,10	6,01	23,73
30	44.83	25.60	20,23	32,21	10,60	3,04	7,99	12,90
40	38.68	22,69	32,37	27,46	10,32	2,66	4,60	2,48
47 (Iso)	30.65	23,02	41,95	21,47	8,72	2,46	9,57	1,52
47 (Tetra)	29.63	21,61	43,71	20,95	8,34	2,51	10,65	0,92
47 (Nanno)	29.74	22,26	42,60	20,51	8,45	2,43	10,14	1,40

De los experimentos anteriores se puede concluir que en la fase de alimentación larvaria con Artemia, los mejores resultados de crecimiento y composición bioquímica de las larvas han sido obtenidos cuando la Artemia se enriquece con la microalga *Isochrysis galbana*, seguidos por *Nannochloropsis* sp2 y *Tetraselmis suecica*.

#### 2.4. Definición del proceso de transición de alimento vivo a alimento inerte.

Los experimentos en este período de las larvas tienen la finalidad de reducir el período de consumo de Artemia para reducir costes en la producción de alevines, sin detrimento de su supervivencia, crecimiento ó calidad.

Existen algunas diferencias en la composición bioquímica de las larvas cuyo destete se había comenzado a día 40 de vida (DA), respecto a las de destete estándar (día 50 de vida). Así, en las larvas con 69 días de vida, sometidas a destete adelantado (DA), el contenido proteico es del 51,5% del peso seco y en las de destete estándar (DS) del 46,5%. Los lípidos totales suponen el 21% del peso seco en ambos casos. Los TAG presentan valores más bajos en larvas con DA que con DS y los fosfolípidos suponen el 25% de los lípidos totales a día 69 de vida.

Los ácidos grasos poliinsaturados (PUFA), presentan valores similares en ambos grupos incrementándose paulatinamente desde el día 40 al 69 de vida en que alcanzan valores entre 42 y 45 ng/ug P.seco. Los contenidos en los ácidos grasos 20:5(n-3) y 22:6(n-3) presentan tendencias contrarias en ambos grupos de larvas. Las larvas con DS presentan un contenido más alto en 20:5(n-3), que las de DA con valores a día 69 de vida de 11 y 6 ng/ugP.seco, respectivamente. El 22:6 (n-3), es más alto en las larvas con DA alcanzando 18 ng/ug P.seco frente a 11 ng/ugP.seco obtenido a día 69 con DS.

Aunque los resultados de composición bioquímica podían resultar esperanzadores y recomendar la introducción del alimento inerte a día 40 de vida de las larvas, no han podido ser ratificados con datos de crecimiento larvario debido a dificultades experimentales, ya que la separación de grupos de larvas de besugo en esta edad causa grandes mortalidades.

En la actualidad se realiza el destete gradualmente en los tanques de cultivo larvario, combinando el suministro de Artemia con el de pienso de destete. Así se mantienen hasta que los alevines alcanzan un tamaño adecuado (alrededor de 2 g) y se alimentan únicamente de pienso, momento en que se realiza su clasificación y separación en tanques de preengorde.

### 3. Engorde de juveniles

#### 3.1. Manejo de juveniles y densidad de estabulación

En todos los experimentos llevados a cabo en Galicia se ha podido observar que los peces mientras presentan un tamaño de aproximadamente 50 g se pueden mantener en tanques de preengorde o engorde de 1.5 m de profundidad y a densidades de 10 kg/m<sup>3</sup>. Pero como se describe posteriormente, tanto el crecimiento como el aspecto de los peces es mejor en jaulas en el mar que en tanques en tierra.

Esto puede ser debido en gran parte a la diferencia de profundidad ya que en las jaulas es de un mínimo de 8 m contra 1.5 m en los tanques por lo que los peces sufren un mayor estrés en los tanques que en las jaulas.

3.2. Avances en la definición de un pienso específico para la especie; tasas de crecimiento y mortalidad.

3.2.1. Cantabria:

Los pesos medios finales alcanzados por los diferentes grupos fueron:

Grupo 1	604± 99 g
Grupo 2	606±102 g
Grupo 3	585± 87 g
Grupo 4	553±99 g
Grupo 5	541±103 g
Grupo 6	539±97 g

El análisis de los datos de crecimiento de los grupos de peces alimentados con las diferentes dietas muestra que no existen diferencias significativas entre ellos.

A pesar del resultado del análisis estadístico se puede observar un mayor crecimiento en los grupos de peces a los que se les suministró aminoácidos en la dieta respecto el grupo alimentado con la dieta estándar. El incremento de peso de estos grupos sobre el grupo estándar (grupo 5) fue de un 11% en el caso del grupo 2, de un 6.5% el grupo 3 y un 6.2% el grupo 4.

El porcentaje de proteínas de los ejemplares osciló entre un 20% en los grupos alimentados con la dieta 2, 3, 4 y 6 y un 21% en los grupos alimentados con la dieta 1 y 5.

El contenido en grasa en el músculo fue muy similar en todos los grupos, encontrándose entre un 4.3 y un 4.8% y no existen diferencias significativas entre ellos. Sin embargo los grupos 3 (con L-carnitina) y 1 (mayor cantidad de aa) son los que presentan el menor porcentaje de grasa muscular (Tabla VI).

Los porcentajes de grasa peritoneal sobre el peso corporal oscilaron entre 2.5 y 3%, correspondiendo los menores a los grupos 4 (L-carnitina+vitamina E) y 1 (mayor cantidad de aa).

Tabla VI. Composición bioquímica del músculo de los juveniles analizados.

	GRUPO 1	GRUPO 2	GRUPO 3	GRUPO 4	GRUPO 5	GRUPO 6
PROTEÍNA	21.38	20.28	20.18	20.41	21.18	20.90
GRASA	4.48	4.79	4.30	4.28	4.33	4.31
HIDRATOS DE C.	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1
HUMEDAD	71.48	73.04	72.80	72.86	72.45	73.10
CENIZAS	1.94	1.94	1.90	1.90	1.88	1.91

3.2.2. Galicia. Los experimentos de engorde en tanques y jaulas fueron realizados en las jaulas de la Consellería de Pesca en Bueu (Pontevedra), en los tanques de las instalaciones del C.O. de Vigo del IEO.y de la planta de cultivos de Couso (CIMA) hasta su transferencia al Cluster de Acuicultura.

3.2.2.1. Engorde de besugo con piensos de distinto contenido graso. Comparación de crecimiento en tanques y jaulas

En junio del año 2001 se inicia un experimento con ejemplares nacidos en 1999 suministrándoles dos piensos con la misma calidad proteica pero con distinto contenido graso (16 y 10%) para comprobar el efecto de la cantidad ó la calidad de los lípidos en el alimento sobre el crecimiento de los juveniles obtenidos en los dos sistemas de cultivo empleados.

Este experimento se realiza durante ocho meses, por duplicado en tanques del Centro de Cultivos de Couso y en las jaulas de Bueu.

El peso inicial de los juveniles de los fue de 291,5 g en los tanques y de 330,4 g en jaulas, y se alcanza un peso final de 402,9 y 403,7 g en los tanques y de 524,8 y 511,4 g en las jaulas, alimentados con piensos de 16% y 10% de grasa respectivamente.

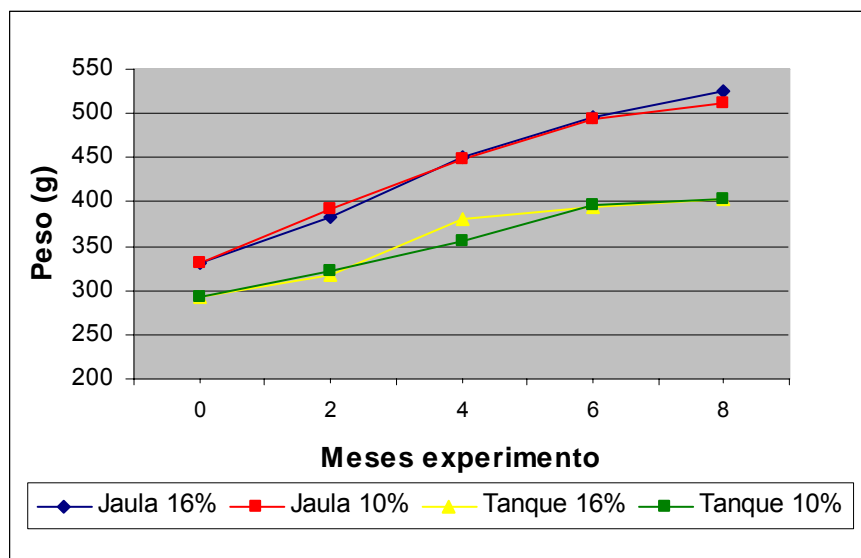


Fig. 5. Crecimiento en tanques y jaulas con piensos de diferente contenido graso.

El análisis de los datos del crecimiento de los juveniles alimentados con los diferentes piensos muestra que no hay diferencias significativas en ninguno de los sistema de cultivo.

3.2.2.2. Influencia de la alimentación con piensos de diferente contenido graso sobre el crecimiento y la composición de los alevines. Engorde de besugo en jaulas.

Se compara el efecto sobre el crecimiento en jaulas y la composición de los alevines de la alimentación con tres piensos con el mismo contenido proteico



(50%) y con dos contenidos grasos (16 y 10% de grasa) y el tercero es una variante de uno de los piensos (16% + aromatizante de calamar).

Para este experimento se trasladan a las jaulas de Bueu 1800 juveniles correspondientes a la puesta natural del año 2000 (AI-2000) y cultivados en el IEO de Vigo que se reparten en tres módulos diferentes. Tras 9,5 meses de engorde los juveniles AI-2000 de peso medio inicial 106,65g alcanzan pesos de 279,86g en los alevines alimentados con Pienso 10% y 291,49g con Pienso del 16% respectivamente (Fig. 6).

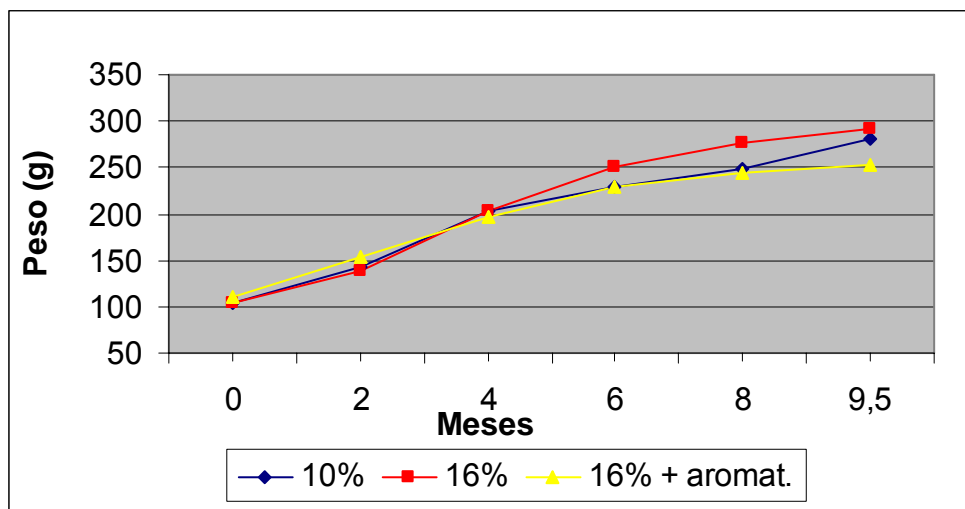


Fig. 6. Crecimiento de alevines de besugo con tres piensos diferentes

No existen diferencias significativas en crecimiento entre los alevines alimentados con los tres piensos pero sin embargo se observa un crecimiento ligeramente inferior, en los alevines alimentados con el pienso al que se ha añadido el aromatizante.

Asimismo se continúa el engorde en jaulas de los juveniles de la puesta del año 1999 (AI-99) con los dos piensos citados. Los juveniles AI-99 después de 9,5 meses de engorde alcanzan pesos de 549,68g y 515,41g con los piensos de 16 y 10% de grasa respectivamente.

La grasa perivisceral oscila entre el 2 y el 7% en los alevines de las puestas de los años 1999 y 2000, no existiendo diferencias significativas entre los alevines alimentados con los diferentes piensos.

Con los datos de los experimentos de crecimiento en jaulas con piensos de diferente contenido graso se construyen las curvas de crecimiento para el período comprendido entre 100 y 600 gramos (Fig.7) donde se puede observar claramente que no existen diferencias significativas en el crecimiento de los juveniles de besugo con los dos tipos de pienso.

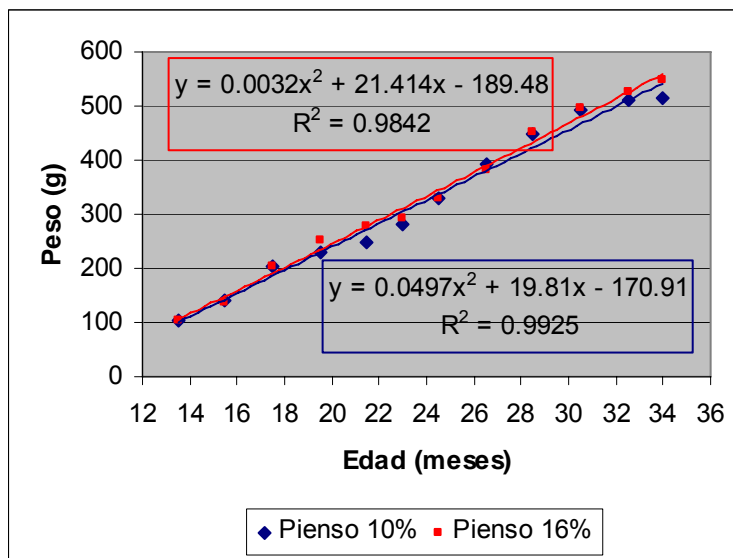


Figura 7. Crecimiento de besugo en jaulas alimentado con piensos de 10% y 16% de grasa.

Con el fin de comprobar si existían diferencias en la composición de los alevines alimentados con los diferentes piensos, se realizaron análisis bioquímicos del hígado y el músculo de los juveniles.

Los resultados obtenidos con los juveniles de la puesta del año 2000, nos indican que no existen diferencias significativas entre los valores de proteínas y lípidos en hígado con los dos piensos probados.

Así, al finalizar el experimento, se alcanzaron en el hígado valores del 40% del peso seco de proteínas y entre el 34 y el 36% de lípidos. En el músculo los valores de proteínas alcanzados son mucho más altos que en el hígado con valores comprendidos entre el 74 y el 77% y al finalizar el experimento, se observa que los alevines alimentados con el pienso de 16% de grasa tienen un contenido lipídico más alto (22,3%) que los alimentados con el pienso del 10% (14,45%).

Tabla VII. Composición en proteínas y lípidos (% peso seco) en el hígado y en el músculo de juveniles alimentados con los piensos de 10 y 16%.

	Hígado		Músculo	
	Inicial	Final	Inicial	Final
Pienso 10%				
Proteín	40.66	39.58	63.44	73.72
Lípidos	28.62	35.95	18.14	14.45
Pienso 16%				
Proteín	40.66	39.79	63.44	77.29
Lípidos	28.62	33.88	18.14	22.30

En cuanto a las clases de lípidos en el hígado de los peces, los triglicéridos y fosfolípidos constituyen entre el 53 y el 94% de los lípidos totales del hígado de los besugos analizados, con una carencia de ceras y un pequeño porcentaje de ácidos y esteroides. Aunque no se manifiesta en todos los muestreos, existe una cierta tendencia a acumular más triglicéridos y menos fosfolípidos en el hígado de los juveniles alimentados con el pienso de mayor contenido graso (16%) respecto al que contiene un 10% de grasa, pero tras 9,5 meses de engorde ambos grupos de peces presentan cantidades similares de estas clases de lípidos. En la Fig. 8 a,b y c se presentan las clases de lípidos tras 6, 8 meses de engorde y al finalizar el experimento. Los lípidos del músculo de los alevines está constituido básicamente por triglicéridos y no se observan diferencias entre los alevines alimentados con los piensos con los dos contenidos grasos.

Respecto los ácidos grasos en el hígado de los peces alimentados con los dos piensos citados, a lo largo del experimento se observa que el hígado de los alevines alimentados con el pienso que tiene un mayor contenido graso (16%) presenta un contenido más alto de PUFA que el de los alevines alimentados con el pienso del 10% de grasa, sin embargo, al finalizar el experimento, ambos tipos de alevines tienen cantidades similares de ácidos grasos en hígado. En músculo, al finalizar el experimento, los contenidos en ácidos grasos en ng/ugP.seco son significativamente más altos en los alevines alimentados con el pienso con mayor contenido graso, pero no existen diferencias en cuanto a los contenidos relativos respecto al total de ácidos grasos. En la Fig 9 a, b y c.se muestra la evolución de los ácidos grasos en hígado en diferentes fases del experimento.

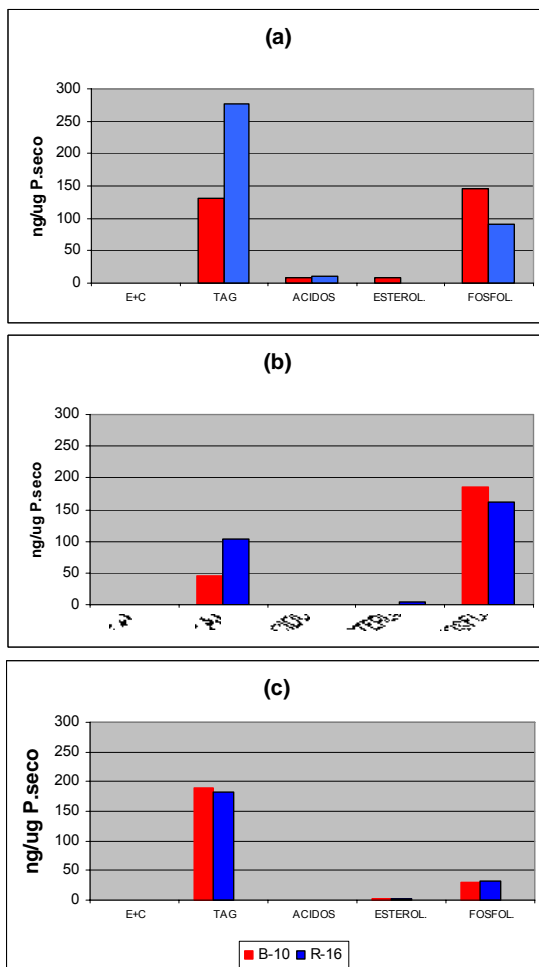


Fig. 9. Clases de lípidos en el hígado de besugo en diferentes fases del experimento desde el inicio. (a) 6 meses. (b) 8 meses. (c) 10 meses.

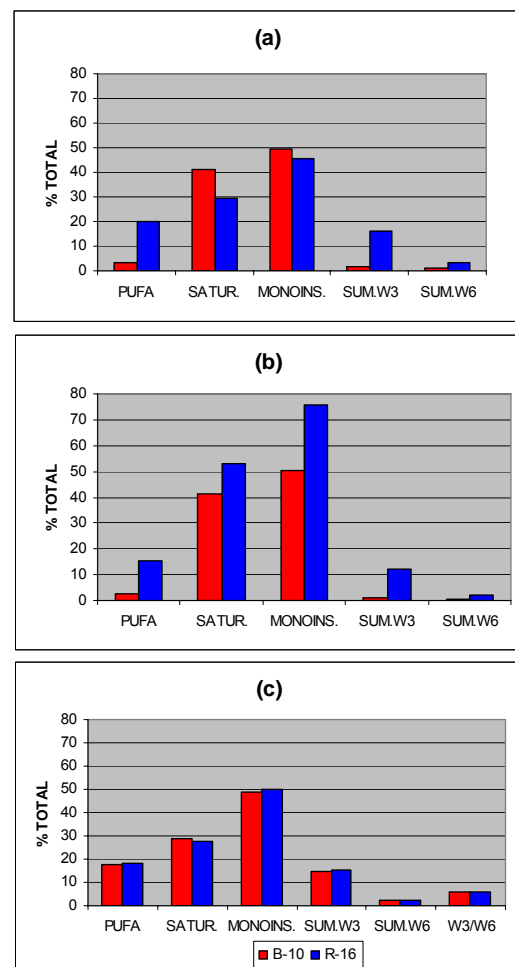


Fig. 10. Ácidos grasos en el hígado de besugo en diferentes fases del experimento desde el inicio. (a) 6 meses. (b) 8 meses. (c) 10 meses.

### 3.2.2.3. Comparación del pienso estándar con nuevos piensos

Este experimento se inició en abril del 2003 con 4000 ejemplares de peso medio  $221,30 \pm 27.6$  gramos y se realizó por duplicado en 4 módulos de las jaulas. Se trataba de probar si existían diferencias en el crecimiento y la composición de los juveniles alimentándolos con dos piensos de la misma formulación proteína /grasa (50/12) fabricados por las casas comerciales Trouw (M-1 y M-2) y Sorgal (P-1 y P-2). Se realizan muestreos bimestrales de peso y talla . Se pesa la grasa perivisceral, se comprueba el estado de desarrollo y se toman muestras de hígado y músculo de los alevines para realizar los análisis bioquímicos.

No se observaron diferencias significativas en el crecimiento de los juveniles alimentados con los dos piensos probados .Los pesos medios alcanzados en enero del 2004 son de  $404,62 \pm 66,16$  y  $399,94 \pm 59,21$  en los alimentados con el pienso de Trouw y de  $427,66 \pm 49,99$  y  $389,60 \pm 65,44$  gramos en los alimentados con el pienso Sorgal (Fig.10).

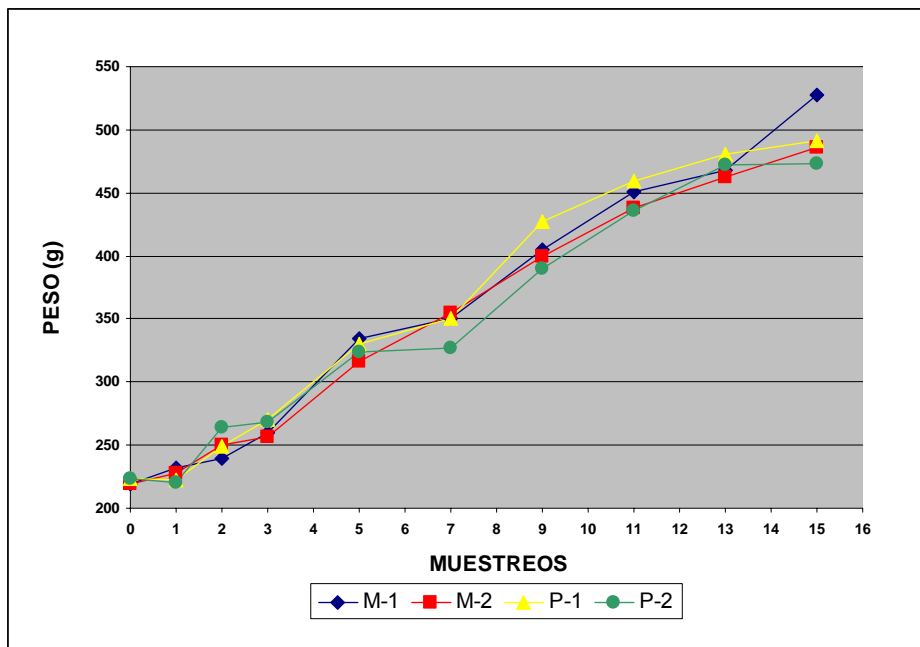


Fig. 10. Crecimiento de besugo con dos piensos diferentes (Trouw y Sorgal).

Se obtienen tasas de crecimiento del 0,22% en ambos casos. Tampoco se observan diferencias en el contenido en grasa perivisceral de los alevines que oscila entre el 1,5 y el 3,5% del peso corporal.

Los resultados de los análisis bioquímicos muestran que el pienso de Sorgal tiene un contenido más alto en ng/ug P.seco de ácidos grasos poliinsaturados, saturados y monoinsaturados, que el pienso de Trouw. (Tabla VIII). El porcentaje más alto de PUFA respecto al total de ácidos grasos en el pienso de Trouw que en el de Sorgal, se debe al contenido relativo de los PUFA de la serie (n-6), mientras que los de la serie (n-3) son más altos en el pienso Sorgal, suponiendo 47,6 ng/ug P.seco frente a 21,1 ng/ug P.seco en el pienso Trouw. Es de destacar la diferencia existente en el contenido en 22:6(n-3) que tiene valores de 9,56 y 27,2 ng/ug P.seco, en los piensos Trouw y Sorgal representando respectivamente, el 12% y el 17% del total de ácidos grasos.

Tabla VIII. Composición en ácidos grasos en ng/ug P.seco (%total) de los piensos de Sorgal y Trouw

	PIENSO TROUW	PIENSO SORGAL
PUFA	34,51 (46,61)	58,21 (37,81)
Saturados	19,65 (30,28)	39,09 (30,22)
Monoinsaturados	15,16 (23,11)	42,66 (31,97)
$\Sigma$ (n-3)	21,12 (27,10)	47,65 (30,20)
$\Sigma$ (n-6)	12,89 (18,77)	9,57 (6,87)
$\Sigma$ (n-3)/ $\Sigma$ (n-6)	1,64 (1,44)	4,98 (4,39)
20:5(n-3)	7,67 (9,80)	13,12 (8,37)
22:6(n-3)	9,60 (11,86)	27,17 (16,77)

Aunque este experimento no se ha terminado y se están realizando los análisis bioquímicos de los alevines de besugo alimentados con los dos piensos citados, los primeros análisis nos indican que existe un reflejo de la composición de los piensos en los alevines.

### 3.3. Evaluación del crecimiento en tanques y jaulas de engorde adecuados a la especie.

Se obtiene la curva de crecimiento en tanques de cultivo en tierra y en jaulas en el mar a partir de ejemplares nacidos en cautividad en el período de crecimiento desde 30 hasta 500 gramos de peso

Los pesos medios obtenidos con ejemplares de 34 gramos de peso medio inicial y tras 24 meses de engorde fueron de 395 y 495 g en tanques y jaulas respectivamente (Fig. 11).

La comparación de pendientes de las curvas de crecimiento ( $p < 0,05$ ) muestra que el crecimiento es significativamente mayor en las jaulas que en los tanques. Además se ha podido comprobar que el aspecto externo de los ejemplares de las jaulas es mejor que el de los tanques en tierra.

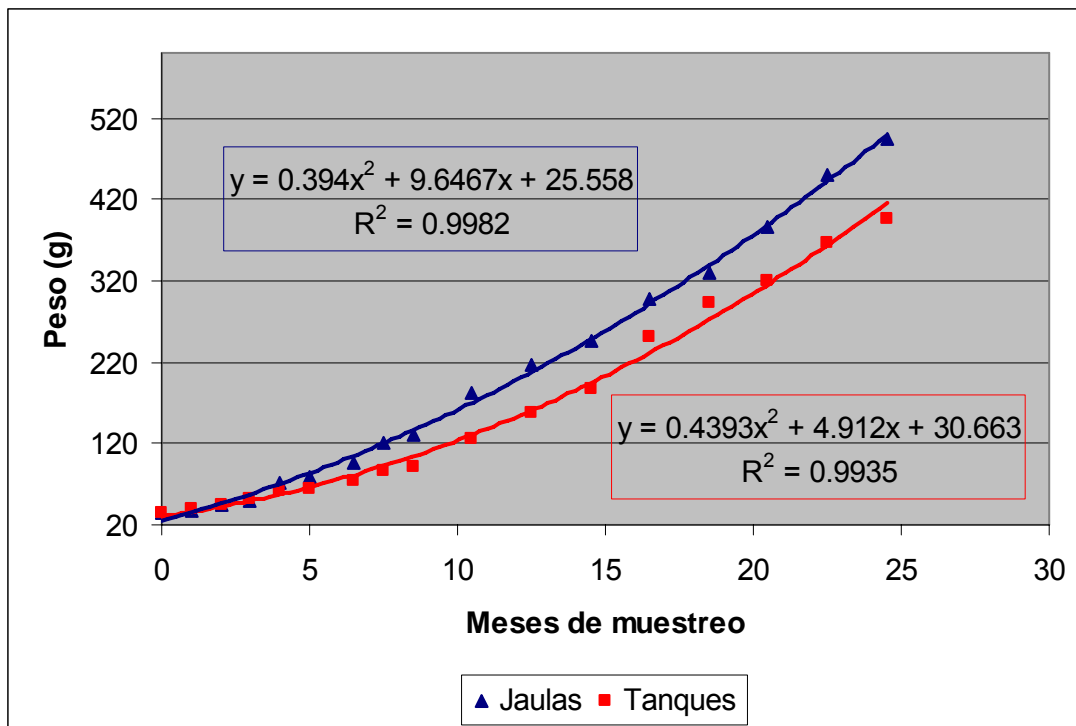


Fig. 9. Curvas de crecimiento de besugo en tanques y jaulas.

#### 4. Estudios genéticos

##### 4.1.1. Caracterización de las poblaciones naturales y de los stocks cultivados, de las diferentes áreas mediante marcadores moleculares (microsatélites).

El análisis de diferenciación génica mostró una alta heterogeneidad de frecuencias entre las poblaciones Cantábrico y Mediterráneo y las muestras Cantábrico y Atlántico. Sin embargo, esto se debe principalmente al locus Pb-OVI-D101, puesto que en su ausencia no existen diferencias significativas entre las poblaciones. La muestra de C.Galicia presenta diferencias significativas frente a las muestras de origen natural, y en este caso no son debidas exclusivamente al locus Pb-OVI-D101, ya que en su ausencia no hay cambios cualitativos en las diferencias observadas.

En las muestras naturales se encontró que la diversidad genética total es alta ( $HT=0,8122$ ), pero solo un 2,1% de la misma de debe a variación entre las muestras, siendo la variación dentro de muestras la que explicaría el 97,9% de la diversidad genética encontrada. Los valores observados por loci son similares, con la notable excepción del locus Pb-OVI-D101, con un valor de 4,62% de variación entre muestras, cuando la media es cercana al 2%.

La distancia genética  $(\delta\mu)^2$  calculada entre las muestras naturales presenta un valor medio de 0,587. La mayor diferencia la encontramos entre las muestras Atlántico y Mediterráneo (0,8322) y Cantábrico y Mediterráneo (0,6654), mientras que entre Cantábrico y Atlántico se observan valores menores (0,2630).

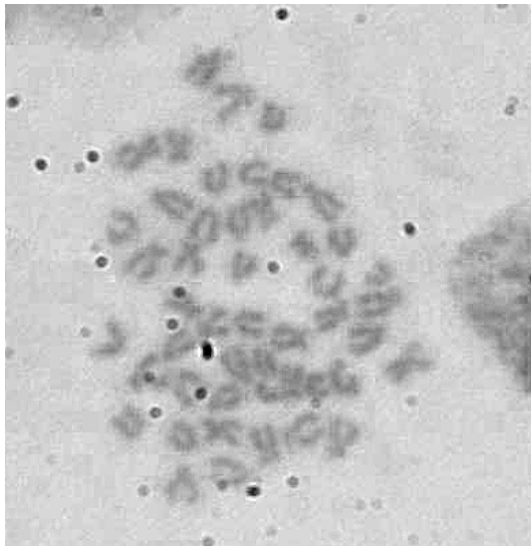


#### 4.1.2. Estudios citogenéticos.

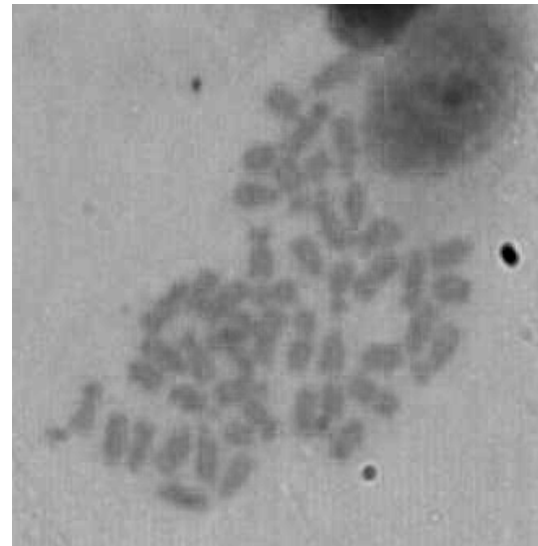
Se ha puesto a punto la obtención de metafases cromosómicas de esta especie analizándose su cariotipo y se han buscado marcadores moleculares, como es el caso de dos ADN satélites, que nos permiten la caracterización molecular del voraz y su utilización en la taxonomía y la filogenia.

##### *Análisis cromosómico*

El cariotipo del voraz está formado por 24 parejas de cromosomas ( $2N=48$ ) (Fig. 10 a y 10 b), al igual que la mayoría de las especies pertenecientes a la familia Sparidae.



**Fig. 10 (a).** Obtención de cromosomas a partir de cultivo de linfocitos



**Fig.10 (b).** Obtención de cromosomas a partir de tejido

Cuando el cariotipo del voraz es comparado con otra especie perteneciente al mismo género como es la breca (*P. erythrinus*), las diferencias en cuanto a la morfología de los cromosomas son notables, existiendo también diferencias en cuanto al número de regiones organizadoras del nucleolo (NORs). (Tabla IX).

Tabla IX. Comparación del número cromosómico diploide (2N), cromosomas acrocéntricos (Ac), subtelocéntricos (ST), submetacéntricos (SM) y metacéntricos (M) del cariotipo de dos especies de *Pagellus*. Organizadores Nucleolares (NORs).

	2N	Ac	ST	SM	M	NORs
<i>P. erythrinus</i>	48	48	0	0	0	2
<i>P. bogaraveo</i>	48	22	8	10	8	4

*Análisis de la divergencia interespecífica del ADN satélite EcoRI en el género Pagellus. Utilidad como marcador taxonómico.*

Utilizando los primeros CEN1 y CEN2 hemos amplificado y clonado el satélite EcoRI en todas las especies de *Pagellus*. Para el análisis de la divergencia de este ADN satélite entre las diferentes especies del género *Pagellus* analizadas se compararon entre sí todas las unidades monoméricas que se tienen de estas especies.

Cuando las unidades monoméricas del voraz (*P. bogaraveo*), la breca (*P. erythrinus*), el aligote (*P. acarne*) y el garapello (*P. bellottii*) son alineadas y comparadas, mediante el programa CLUSTAL X (Thompson et al., 1997), se puede observar las diferencias existentes entre ellas, incluso de tamaños. Así, el voraz presenta una unidad de repetición del ADN satélite centromérico EcoRI del doble de tamaño que la breca, siendo la del voraz de 372 pb y la de la breca de 187pb. Por otro lado, el aligote presenta una unidad de repetición correspondiente aproximadamente a un monómero y medio de la breca (265 pb), siendo la unidad más pequeña la del garapello con 165 pb.

Esta característica de las diferentes longitudes de las unidades de repetición hace de este ADN satélite un buen marcador para identificar a los individuos pertenecientes a las diferentes especies del género *Pagellus*, pudiendo por tanto ser utilizado como un excelente marcador taxonómico entre las diferentes especies de este género.

Pero las diferencias existentes para este ADN satélite en las especies del género *Pagellus* no sólo quedan reflejadas en los diferentes tamaños de la unidad de repetición sino también a nivel de secuencia nucleotídica.

Para cuantificar estas diferencias hemos calculado la divergencia media (Nei, 1987) entre las secuencias monoméricas de la familia de ADN satélite EcoRI entre las diferentes especies, mostrándose sus valores en la Tabla X.

Tabla X. Divergencia media del ADN satélite EcoRI entre las diferentes especies del género *Pagellus*. En la diagonal y en negrita se muestra la variabilidad intraespecífica.

	<i>P. bogaraveo</i>	<i>P. acarne</i>	<i>P. erythrinus</i>	<i>P. bellottii</i>
<i>P. bogaraveo</i>	<b>0.012</b>			
<i>P. acarne</i>	0.496	<b>0.043</b>		
<i>P. erythrinus</i>	0.512	0.524	<b>0.024</b>	
<i>P. bellottii</i>	0.449	0.522	0.223	<b>0.030</b>

La diversidad intraespecífica calculada en cada una de las especies se muestra en la diagonal y son menores que las divergencias interespecíficas. El hecho de que existan mayores diferencias entre unidades de repetición de diferentes especies que dentro de una especie muestra por tanto la existencia de evolución concertada de estas secuencias repetidas.

Cuando se utiliza el alineamiento múltiple entre las secuencias de las cuatro especies analizadas de *Pagellus* para realizar un árbol de distancias, utilizando el método de Neighbor-Joining mediante el programa informático MEGA2 (Kumar et al. 2001), el resultado obtenido muestra el agrupamiento de las diferentes unidades monoméricas para cada una de las especies. Los grupos de secuencias para cada especie, a su vez, quedan agrupadas de dos en dos. Así, las de *P. bogaraveo* aparecen relacionadas con las de *P. acarne*, mientras que las de *P. erythrinus* lo hacen con las de *P. bellottii* (Figura 11).

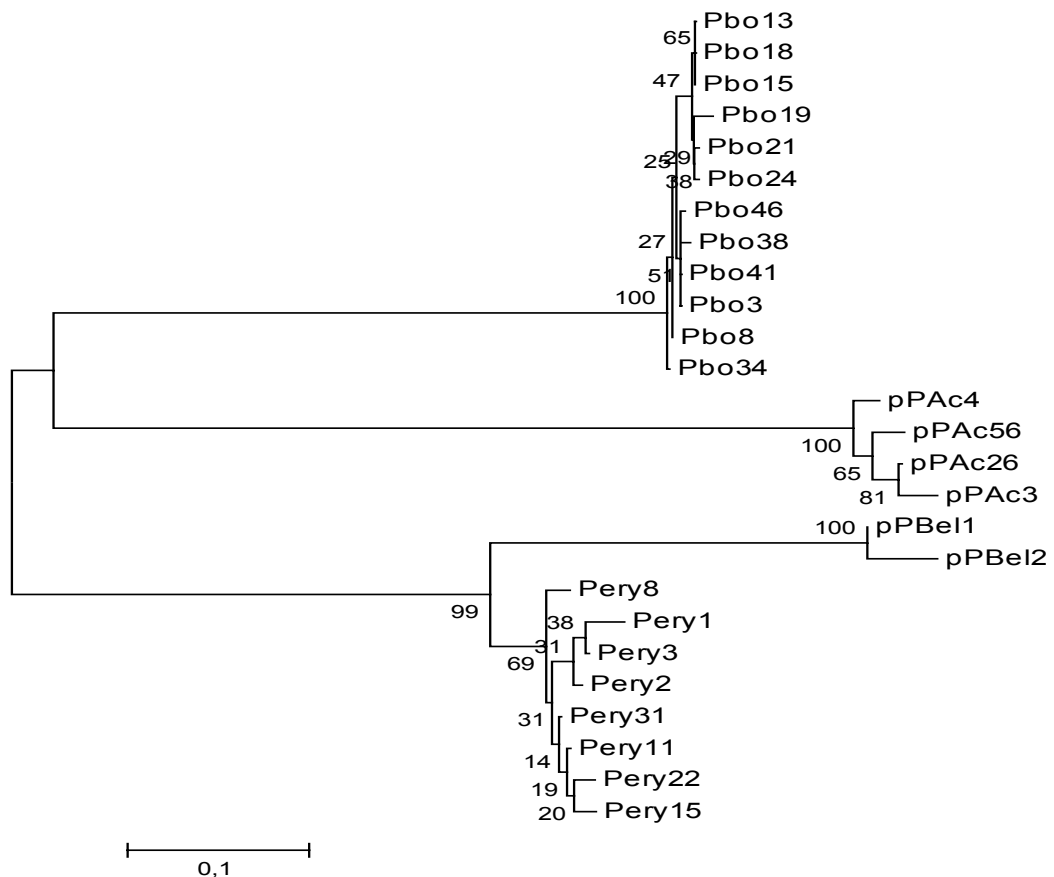


Fig. 11. Árbol de distancias de las distintas secuencias monoméricas caracterizadas en las cuatro especies de *Pagellus*. *P. bogaraveo* (Pbo), *P. acarne* (pPAC), *P. erythrinus* (Pery) y *P. bellottii* (pPBel).

*Análisis de la divergencia interespecífica del ADN satélite Dral en el género Pagellus .Utilidad como marcador taxonómico*

Utilizando los primeros DRA1 y DRA2 se ha comprobado que esta familia de ADN satélite Dral está ausente en el genoma de *P. bogaraveo* y *P. acarne* y presente en el de *P. erythrinus* y de *P. bellottii*, diferenciando claramente estos dos grupos de especies ya que la presencia o ausencia de un ADN satélite es utilizado como marcador cladístico.

Para el análisis de la divergencia de este ADN satélite entre las diferentes especies del género *Pagellus* se compararon entre sí las unidades monoméricas de las especies de *Pagellus* que presentan este tipo de secuencias, *P. erythrinus* y *P. bellottii*. La divergencia entre ambas especies llega hasta el 0.19, encontrándose posiciones diagnósticas que las diferencian, tal como se muestra en la Figura 12, en la cual se han alineado dos unidades representativas de la breca y al garapello.

CLUSTAL X (1.64B) MULTIPLE SEQUENCE ALIGNMENT

```

P. ERYTHRINUS      -----
P. BELLOTII       CAAATCTT

P. ERYTHRINUS      ----AAAAATACAAATTCCACCCGAATCGAACGGGACTGCT-GTGTCTCGTTCAGCCA
P. BELLOTII       CGTAAAAAATACAAATTCCGCCGGAATCCAACCAAACCGGCTAGCCTCACTTCCACCGG
                ***** ** ***** **          *** * ** * * * *

P. ERYTHRINUS      CTATAGGACCACGTCTGGGCGAAATTTTCGAGTCAATCGGTCCAGCAA-TCCCTAACCCCT
P. BELLOTII       CG--AGGAGGACATGCGTGATCGATTTTCGAGTCAATCGGTCCAGCAA-TCCGTAACCCT
                *  **** ** * *          ***** ** *****

P. ERYTHRINUS      AACCTAACCCCTAACCCCTAACCCAGCCCTAAGCCAGCCCGAGGACATTGTCCCCCTC
P. BELLOTII       AACCTAACCCCTAACCCCTAACCCAGCCCTAAGCCAGCCCGAGGACCATGTCCCTCTC
                ***** ** *****
    
```

Figura 12. Alineamiento de las secuencias monoméricas del ADN satélite Dral caracterizado en la especie *P. bellottii* y *P. erythrinus*. Los asteriscos indican nucleótidos idénticos en las secuencias.

Al igual que ocurre con el ADN satélite EcoRI, este ADN satélite Dral, es capaz de diferenciar las especies de *Pagellus* siendo por tanto un buen marcador taxonómico. Este análisis se ha ampliado a todas las especies de espáridos en las cuales, y en trabajos anteriores (Garrido-Ramos et al. 1999, Garrido-Ramos et al., 1998, De la Herrán et al, 2001), se había puesto de manifiesto la presencia de este ADN satélite Dral. Para ello, se comparó una unidad de repetición representativa de cada una de estas especies como son *Dentex dentex*, *Dentex canariensis*, *Dentex gibbosus*, *Pagrus pagrus*, *Pagrus auriga* y las dos especies de *Pagellus* que presentan estas secuencias.

La divergencia media entre estas secuencias monoméricas de la familia de ADN satélite Dral entre las diferentes especies se muestra en la Tabla XI.

Tabla XI. Divergencia media del ADN satélite Dral entre las diferentes especies de espáridos.

	<i>Dentex gibbosus</i>	<i>Dentex canariensis</i>	<i>Pagrus pagrus</i>	<i>Pagrus auriga</i>	<i>Dentex dentex</i>	<i>Pagellus erythrinus</i>
<i>D. gibbosus</i>						
<i>D. canariensis</i>	0.107					
<i>P. pagrus</i>	0.135	0,155				
<i>P. auriga</i>	0,112	0,144	0,088			
<i>D. dentex</i>	0.152	0.166	0.169	0.140		
<i>P.erythrinus</i>	0.297	0.323	0.287	0.277	0.344	
<i>P. bellottii</i>	0.410	0.422	0.411	0.425	0.411	0.189

Estas distancias fueron utilizadas para la realización de un árbol filogenético utilizando el método de Neighbor-Joining mediante el programa informático MEGA2 (Kumar et al. 2001). El resultado obtenido se muestra en la Figura 13. En ella se puede observar cómo las dos especies del género *Pagellus* quedan agrupadas entre sí, indicando su estrecha relación filogenética.

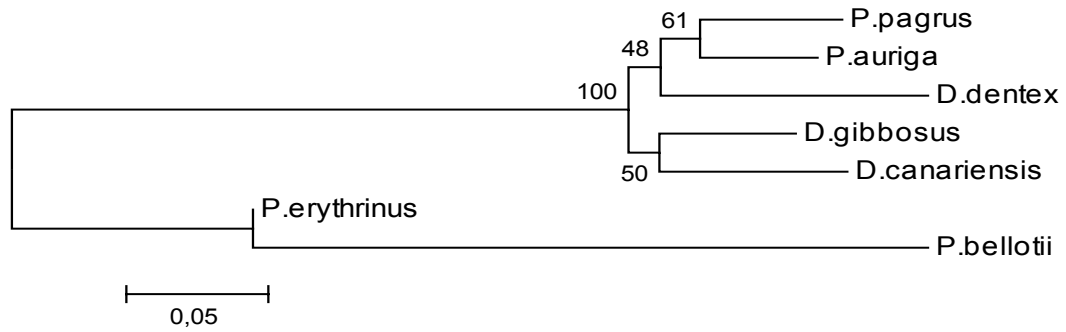


Fig. 13. Árbol de distancias de las secuencias de ADN satélite DraI de las diferentes especies de espáridos en las cuales se encuentra presente.

*Utilidad conjunta de las dos familias de ADN satélite (EcoRI y DraI) como marcadores filogenéticos del género Pagellus.*

Estos dos marcadores, pueden ser utilizados conjuntamente para analizar la relación filogenética existente entre las especies de *Pagellus* y las demás especies de espáridos, ya que coinciden en sus resultados.

Para ello, se han alineado secuencias monoméricas de la familia de ADN satélite EcoRI (presente en todas las especies) representativas para cada una de las especies de *Pagellus*, así como para aquellas especies de espáridos previamente caracterizadas en estudios anteriores (Garrido-Ramos et al. 1999, De la Herrán et al, 2001).

Este alineamiento ha sido utilizado para la realización de un árbol filogenético que se muestra en la Figura 14. En este árbol se observan las relaciones existentes entre las diferentes especies de *Pagellus* y las relaciones de éstas con el resto de especies de espáridos. En él podemos observar la existencia de dos grupos monofiléticos dentro de la familia Sparidae.

A uno de los dos linajes pertenecen las especies de los géneros *Dentex* y *Pagrus*. Al otro las especies de los géneros *Sparus*, *Diplodus*, *Lithognathus*, *SpondylIOSoma*, *Boops* y *Sarpa*. Cabe destacar el caso precisamente del género *Pagellus*, cuyas especies, perteneciendo al mismo género morfológico, aparecen en clados diferentes. Así, en el análisis del ADN satélite EcoRI, las especies *P. acarne* y *P. bogaraveo* aparecen íntimamente relacionados y se encuentran en uno de los linajes, junto con los sargos, la herrera, la chopo o la dorada presentando una mayor homología con estas especies que con las otras dos especies de *Pagellus*. Por el contrario, estas otras especies de *Pagellus* analizadas, *P. bellottii* y *P. erythrinus*, aparecen relacionadas entre sí, y cercanas a las especies del género *Dentex* y *Pagrus*, formando parte del otro linaje.

Este mismo hecho se repite en el análisis del otro marcador, la familia Dral. Como ya se ha comentado, esta familia de secuencias repetidas se encuentra restringida a sólo unas cuantas especies de espáridos como son las pertenecientes al género *Dentex* y las del género *Pagrus*. En el resto de géneros este marcador está ausente. Sin embargo, el género *Pagellus*, es una excepción pues de las especies analizadas, *P. erythrinus* y *P. bellottii* presentan este marcador molecular mientras que *P. bogaraveo* y *P. acarne* no presenta estas secuencias en sus genomas. Este marcador por tanto, vuelve a relacionar la breca con los dentones y pargos, mostrando las otras dos especies de *Pagellus* una mayor afinidad filogenética con las otras especies que carecen de secuencias Dral (Fig. 14).



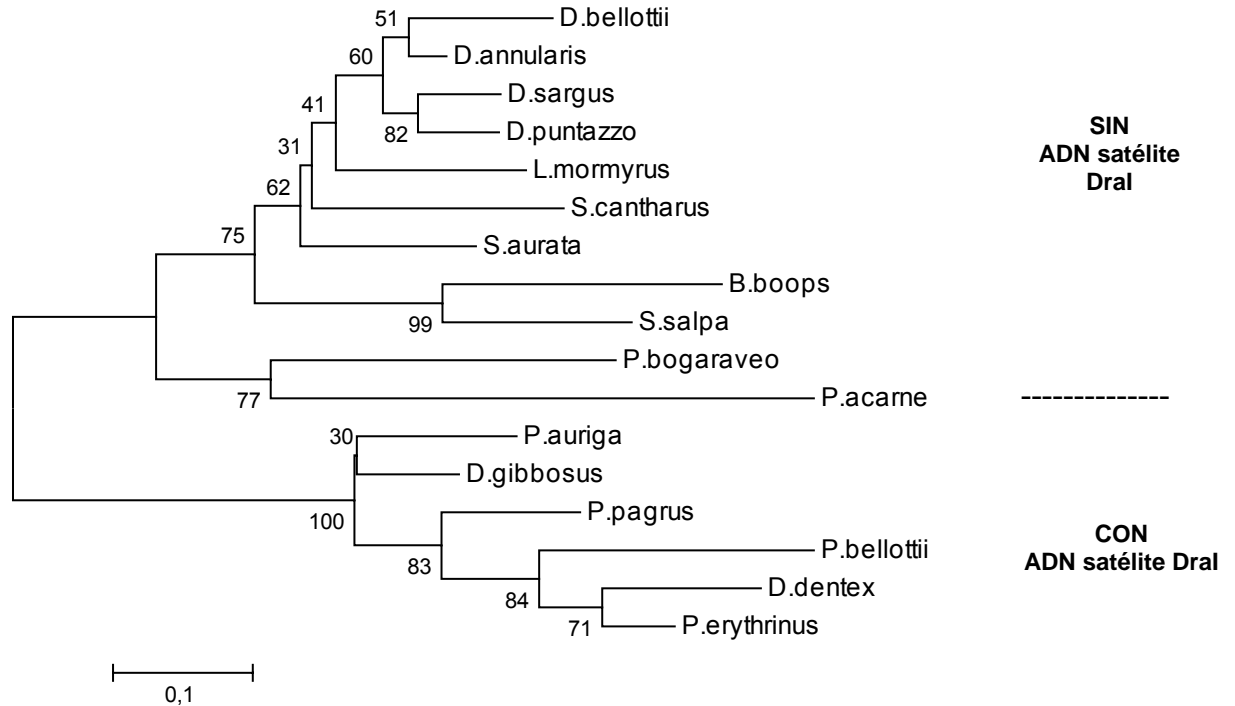


Figura 14. Árbol de distancias de las secuencias de ADN satélite EcoRI de diferentes especies de espáridos. Se indica la presencia o ausencia del ADN satélite Dra1 en ambos linajes.

De esta forma, los dos marcadores sugieren que las especies *P. bogaraveo* y *P. acarne* no pertenecen al mismo clado que *P. bellottii* y *P. erythrinus*, siendo la agrupación de estas especies en un mismo género una clasificación artificial pudiendo por tanto ser una clasificación errónea.

#### *Utilidad del ADN satélite EcoRI como marcador poblacional*

Mediante este análisis se pretende comprobar si este marcador molecular puede ser utilizado también para la diferenciación de individuos pertenecientes a distintas poblaciones naturales de la especie *P. bogaraveo*. El estudio está encaminado a la comparación de las poblaciones existentes en las costas de la Península Ibérica como son las del Mediterráneo y del Cantábrico.

Se ha comprobado a nivel inicial si existen diferencias en secuencia entre las unidades de repetición EcoRI de poblaciones aisladas geográficamente como podría ser el caso de la mediterránea y la cantábrica. Para ello, a las secuencias pertenecientes a individuos de poblaciones del Mediterráneo, se les han sumado nuevas secuencias de individuos procedentes del Cantábrico. Para ello, tres monómeros de tres individuos diferentes del Cantábrico han sido caracterizados y los hemos alineado con las secuencias del Mediterráneo.

Hemos utilizado este alineamiento para la realización de un árbol de distancias que se muestra en la Figura 15. Se puede observar cómo las secuencias pertenecientes a los individuos capturados en el Cantábrico se encuentran agrupadas entre sí, indicando que este tipo de secuencias podrían ser utilizadas como marcador molecular que pudiera agrupar a los individuos pertenecientes a la misma población.

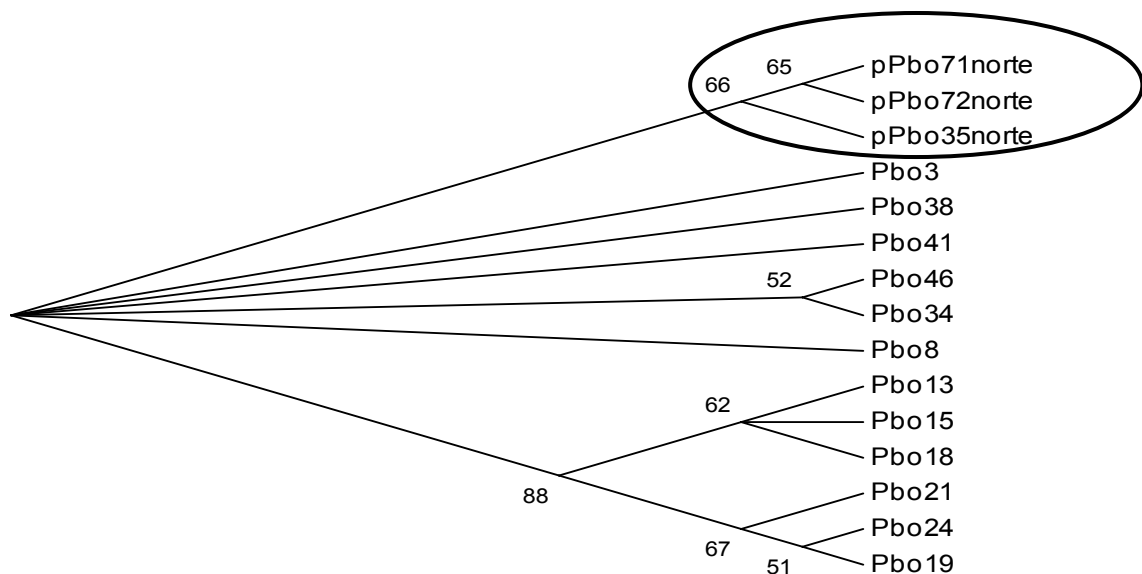


Figura 15. Árbol de distancias de las secuencias de ADN satélite EcoRI aisladas de individuos capturados en el Mediterráneo y en el Cantábrico. Se señala el agrupamiento de las secuencias caracterizadas en ejemplares del Cantábrico.

4.2. Estudio de la endogamia en las poblaciones cultivadas y en los programas de selección.

#### *Asignación de Paternidades*

Los análisis previos realizados mediante el programa Cervus 2.0 indican que los siete microsatélites empleados en este análisis presentan elevados valores en cuanto a número medio de alelos por locus, heterocigosidades observadas y esperadas y PIC. La única excepción sería el locus Pb-OVI-D108, que presenta valores bajos, con un PIC inferior a 0,5 en todas las muestras.

Una primera simulación realizada a partir de los genotipos identificados en cada lote reproductor, permitió una primera evaluación tras 10000 ciclos de asignación en base a las frecuencias alélicas estimadas, obteniéndose valores de acierto (pareja parental correcta) superiores al 90% en todos los casos.

En las pruebas realizadas, el porcentaje de acierto en las asignaciones es creciente cuanto mayor es el número de loci con  $PIC=0,7$  que utilizamos. Así, con 7 loci que cumplan ese criterio observamos un 84,8% de acierto, valor que aumenta 86,2% y 92,4% con 8 y 9 loci, respectivamente. A partir de 10 loci microsatélites obtenemos un valor de 99,2%, valor que permanece estable con 11 loci y que aumenta ligeramente, hasta un 99,6%, cuando aumentamos a 12. Así, considerando únicamente este aspecto, la información aportada por un mayor número de loci no incluiría grandes cambios una vez superamos ese umbral de 10-12 loci con altos valores de PIC.

Dentro de cada lote de reproductores se seleccionaron 10 individuos al azar, considerando a 5 de ellos como hembras y a 5 como machos. Se generaron 10 descendientes por cruzamiento a partir de todos los posibles cruzamientos (5x5), obteniéndose un total de 250 descendientes.

Estos descendientes se enfrentan al total de individuos del lote reproductor en dos pasos, de forma que primero se identifique el parental más probable y posteriormente se identifique el parental que complemente la pareja con máxima probabilidad de cada descendiente. El uso de descendencias simuladas permitió estimar en un 100% el porcentaje de asignación correcta en la muestra Atlántico. Valores que se reducen a 99,6% en la muestra R1, 96,4% en R2 y 94,4% en R5, y que en conjunto son similares a los obtenidos tras la simulación de 10000 ciclos ya comentada.

Cuando consideramos portador de alelo nulo al único parental homocigoto para un determinado alelo, el porcentaje de asignación correcta fue del 90,8%. Mientras que al considerar portador a un homocigoto entre varios para un mismo alelo, el porcentaje sube ligeramente al 91,2%. Cuando realizamos una asignación eliminando el locus Pb-OVI-D101, el valor de asignación correcta asciende al 97,2%.

### *Relaciones de parentesco*

Para determinar si los loci microsatélites escogidos son capaces de estimar el grado de parentesco entre individuos de origen desconocido, y si el coeficiente de relación genética ( $r$ ) resulta un parámetro útil en la discriminación de individuos no emparentados, medio hermanos y hermanos completos, se acudió a descendencias de pedigrí conocido. Por ello recurrimos a las descendencias generadas por ordenador a partir del cruzamiento de individuos del lote reproductor. Al igual que en el apartado exterior, se escogieron 10 individuos al azar y se generaron un total de 250 descendientes. El coeficiente de relación genética se estima al comparar dos individuos entre sí. La relación de parentesco entre los descendientes es perfectamente conocido por lo que podemos separar los valores de  $r$  en las siguientes clases: hermanos completos, medio hermanos y no emparentados.

Los valores (valores medios) obtenidos a partir de dichas descendencias varían desde 0,48 (Atlántico) a 0,54 (R2) entre hermanos completos; desde 0,1816 (Atlántico) a 0,1994 (R2) entre medio hermanos y desde -0,1203 (Atlántico) a -0,135 (R2) entre individuos no relacionados.

Pero para evitar el aumento de endogamia a lo largo de sucesivas generaciones es fundamental evitar en lo posible el cruzamiento de individuos emparentados. Esto nos lleva a buscar un criterio que permita seleccionar aquellos individuos que realmente no estén emparentados para realizar cruzamientos dirigidos. Teóricamente individuos que muestren un valor de  $r \leq 0$  serían individuos no emparentados. Para evaluar la fiabilidad de dicho criterio se estimó, dentro del total de comparaciones que presentan valor  $r \leq 0$ , el porcentaje de las mismas que se dan entre individuos realmente no emparentados. Así, en la muestra Atlántico se observó que el 90,87% de las comparaciones que cumplían dicho requisito se daban entre individuos realmente no emparentados. Este valor es similar al obtenido para el resto de muestras, siendo de 92,71% en R1, de 91,37% en R2 y 89,52% en R5.

También se realizó una estima media del nivel de endogamia de las muestras naturales, valores de que oscilaron entre -0,00781 en R5 y -0,01351 en R2. Por comparación con las medias obtenidas en las clases catalogadas para los descendientes, podemos ver que el nivel de similitud genética dentro del lote reproductor es bajo, acercándose más a valores de individuos no emparentados.

Si aplicamos el criterio  $r \leq 0$ , debemos hacerlo sobre comparaciones entre individuos de sexo opuesto. Al desconocer el sexo de los individuos de los lotes reproductores, asumimos que el 50% de la muestra son hembras y el 50% machos. Por poner un ejemplo, utilizado el lote Atlántico (N=40) se observa que hay 400 cruzamientos posibles, de los que 226 se podrían realizar entre parejas no emparentadas, lo que representa un 56,5% de los cruces totales.

## 5. Estudios patológicos

### 5.1. Estudio y control de patologías de origen bacteriano.

En Galicia de todos los análisis de las muestras recogidas solamente en dos ocasiones apareció infección por *Pseudomonas anguilliseptica* que se pudo paliar con el suministro de pienso medicado con oxitetraciclina. La mortalidad ocasionada no superó el 10%.

### 5.2. Estudio de la aparición de malformaciones.

Solamente se han estudiado los porcentajes de malformaciones que aparecen en los alevines como son, carencia de opérculo/s, problemas de columna. La carencia de opérculo a lo largo de los años fue del 5-15% de los individuos y las malformaciones en la columna, no ha superado nunca el 0.5% de los individuos.

## CONCLUSIONES

### Cantabria

1. La adición de L-carnitina en las dosis ensayadas en la alimentación de reproductores mejoró la calidad de las puestas.

2. La adición de L-carnitina, ácido fólico y vitamina E influyen favorablemente en la supervivencia larvaria.

3. El suplemento de aminoácidos esenciales (AAE: metionina, lisina, treonina, arginina, cistina, y triptófano) al alimento sugiere que las exigencias nutricionales del besugo, como en otros teleósteos, no están condicionadas

solamente a la cantidad de proteína si no a la disponibilidad de aminoácidos esenciales. Se ve la necesidad de continuar con estos estudios.

4. Se observó un mayor crecimiento en los ejemplares alimentados con suplemento de los AAE ensayados. En los juveniles alimentados con pienso+L-carnitina el crecimiento fue similar y el contenido en grasa peritoneal fue menor. El contenido en grasa muscular, muy similar en todos los grupos, también fue ligeramente menor en los grupos suplementados con L-carnitina o L-carnitina+vitamina E.

## Galicia

1. El período de puesta natural del besugo abarca desde los meses de febrero a mayo con un pico de actividad entre los meses de marzo y abril. Existe una relación directa entre los valores de los índices gonadosomáticos (IGS) y el grado de desarrollo en hembras y machos

2. Los análisis de composición bioquímica muestran la relación existente entre el contenido lipídico de las gónadas femeninas y el grado de desarrollo de los ejemplares con una gran acumulación de lípidos fundamentalmente triglicéridos durante el período de desove; por el contrario el contenido de lípidos en el hígado está en relación inversa al grado de desarrollo gonadal de machos y hembras

3. Existen diferencias en la acumulación de grasa perivisceral y en la composición lipídica entre los ejemplares procedentes del medio natural y los de cultivo intensivo, resultando estos últimos con un acúmulo mucho más alto de grasa perivisceral y en hígado y músculo que los del medio natural.

4. Se obtienen puestas en cautividad de manera regular durante el período de puesta natural. Posibles alteraciones de las condiciones idóneas de estabulación provocan stress en los reproductores de besugo mantenidos en

cautividad que afectan de manera directa al rendimiento de los ejemplares, que en condiciones extremas pueden llegar a la inhibición total de la maduración.

5. El crecimiento de las larvas alimentadas con presas vivas enriquecidas con diferentes microalgas (*Isochrysis galbana*, *Nannochloropsis sp2* y *Tetraselmis suecica*) fue mayor en aquellas que se utilizó *I. galbana* como enriquecedor, seguida por *N. sp2* y *T. suecica*.

El contenido proteico de las larvas al finalizar el período de alimentación viva es más alto en las larvas alimentadas con rotífero y Artemia enriquecidos con *Isochrysis galbana* que cuando las presas se enriquecen con las otras microalgas experimentadas. El contenido en fosfolípidos es más alto en las larvas alimentadas con Artemia enriquecida con *I. galbana* y *N. sp2* que en las alimentadas con Artemia enriquecida con *Tetraselmis*.

6. Las curvas de crecimiento obtenidas en tanques y jaulas nos muestran que los ejemplares presentan un mejor crecimiento en jaulas que en tanques. Asimismo los ejemplares engordados en jaulas presentan un mejor aspecto externo y una mortalidad inferior a los engordados en tanques en tierra.

7. No existen diferencias significativas de crecimiento en ejemplares alimentados con piensos con 50% de proteínas y contenidos grasos del 16 y 10% (50/16 y 50/10). Los contenidos en proteínas y lípidos en el hígado de los ejemplares no presentan diferencias, sin embargo se encontró un mayor contenido lipídico, en el músculo de los ejemplares alimentados con el pienso 50/16 que con el 50/10.

#### ANDALUCIA. Estudios citogenéticos

1. Se han puesto a punto las técnicas citogenéticas en el besugo a partir de diferentes tejidos como son el hígado, la sangre o las larvas.



2. Se ha utilizado tanto el ADN satélite EcoRI como el ADN satélite Dral como marcadores taxonómicos entre las diferentes especies de *Pagellus*. Mediante la utilización de ambos marcadores se han realizado algunas consideraciones filogenéticas del género *Pagellus*, poniéndose de manifiesto la asociación entre *P. bogaraveo* y *P. acarne* por un lado y entre *P. erythrinus* y *P. bellotti* por otro. Mediante este análisis se demuestra que este género es un género artificial pues las especies que lo componen pertenecen a diferentes linajes dentro de la familia Sparidae

3. Mediante el análisis del ADN satélite EcoRI de diferentes individuos de poblaciones del Mediterráneo y del Cantábrico se ha puesto de manifiesto la posible utilidad de estas secuencias como marcador poblacional para la identificación de individuos procedentes de una u otra zona geográfica.

Asturias. Universidad de Oviedo

1.- Se han aislado 42 secuencias microsátélites en besugo, para 12 de las cuales se han optimizado sus condiciones de amplificación mediante PCR

2.- El análisis de 7 de esos marcadores en tres muestras de origen natural de distinto origen (mediterráneo, cantábrico y atlántico), en una muestra de cautividad ( descendientes F1 de un lote de reproductores mantenidos en cautividad) y en tres lotes que se han creado como futuros lotes de cultivo, revela un alto grado de polimorfismo de los mismos, oscilando el número de alelos por locus desde 25 (Pb-Ovi-B2) a 6 (Pb-Ovi-D108) aunque no todos los alelos están presentes simultáneamente en todas las muestras.

3.- En general, los alelos más frecuentes son los mismos en todas las muestras analizadas y aquellos alelos específicos de población ( presentes en una sola de ellas) se presentan con frecuencias muy bajas por lo que tienen poca eficacia como marcadores de población

4.- En las muestras naturales se encontró una alta diversidad genética total, aunque sólo el 2,1% de esta se debe a diversidad entre muestras y el 97,9% restante se debe a variación dentro de muestras, lo que indica que aunque existen diferencias entre muestras a nivel de frecuencias génicas, cada una de las muestras contiene la mayoría de la diversidad genética encontrada

5.- Mediante procesos de simulación, se ha evaluado la eficacia de los marcadores para la asignación de paternidades, encontrándose que el porcentaje de asignación correcta es función del número de loci empleados de su PIC (índice de contenido polimórfico) de forma que considerando loci con  $PIC = 0,7$  el porcentaje de acierto pasa del 84,8% cuando se consideran 7 loci al 99,2% al considerar 10 loci, valor que aumenta de forma ligera (99,6%) al incrementar el número de loci hasta 12.

6.- También se evaluó la eficacia de estos marcadores en la estimación del grado de parentesco entre individuos cuando se desconoce el pedigrí de estos, encontrándose que cuando se estimaban entre dos individuos coeficientes de parentesco iguales o menores de 0 (lo que teóricamente implicaría que esos dos individuos no estaban emparentados) entre el 90 y el 93% de las comparaciones realizadas se efectuaba entre individuos que realmente no estaban emparentados.

**VALORACIÓN**

En general, se han cumplido los plazos previstos para la ejecución del proyecto ya que se ha contado con la colaboración de las C.C.A.A. y de los Centros de Investigación participantes, adelantando los fondos imprescindibles para poder llevar a cabo las tareas correspondientes a cada año.

**DIFUSIÓN**

Parte de los resultados de este proyecto se han difundido en comunicaciones a congresos tanto nacionales como internacionales.

**Universidad de Oviedo**

Blanco, G., J. Álvarez, E. Vázquez & J.A. Sánchez. 2002. Developing genetics tools for monitoring a new cultivated species, *Pagellus bogaraveo*. ICES. 1-5 October, Copenhagen, Denmark

Blanco, G., J. Álvarez, E. Vázquez & J.A. Sánchez. 2002. Developing molecular genetic markers for monitoring genetics changes in a new cultivated species *Pagellus bogaraveo*. Aquaculture Europe 2002. 16-19 October. Trieste, Italia.

Alvarez, J.; Blanco, G.; Vázquez, E. y Sánchez, J:A. 2003. Aplicación de los marcadores microsatélites a los programas de cultivo de besugo (*Pagellus bogaraveo*). Poster. IX Congreso Nacional de Acuicultura. Cádiz. España.

Álvarez Piñeira, J. 2003. Evaluación de loci microsatélite para la optimización del cultivo de besugo, *Pagellus bogaraveo*". Seminario de Investigación. Universidad de Oviedo.

**CIMA y CO de Vigo**

Linares, F., M. Olmedo, J.B. Peleteiro & J. Arán. 2001. On-growing and biochemical composition of blackspot sea bream (*Pagellus bogaraveo*) juveniles fed with different dry food. Poster. Larvi2001. Guent (Bélgica). European Aquaculture Society. Special Publication nº 30. 318.

Linares F., M. Olmedo, A. Ortega & J.B. Peleteiro. 2001. Experiencias de engorde de besugo, *Pagellus bogaraveo* (Brünich, 1768) en jaulas y tanques de cultivo. Monografías del Instituto Canario de Ciencias Marinas, Vol. 4: 206-210.

Linares F., M. Olmedo & J.B. Peleteiro. 2002. Biochemical composition of Blackspot sea bream larvae, *Pagellus bogaraveo*, fed with rotifer enriched with three different microalgae. Aquaculture Europe 2002. European Aquaculture Society. Special publication N°. 32: 301-302.

Linares, F., M. Olmedo & J.B. Peleteiro. 2003. Crecimiento y composición de larvas de besugo, *Pagellus bogaraveo*, alimentadas con *Artemia* enriquecida con tres microalgas diferentes. Poster. IX Congreso Nacional de Acuicultura.

Linares F., M. Olmedo & J.B. Peleteiro 2004 Influence of feeding with feeds having a different fat content on the growth and composition of blackspot sea bream (*Pagellus bogaraveo*) juveniles. Extended Abstracts and short communications. European Aquaculture Society. Special Publicación. N° 34.

Olmedo, M., Linares, F. y Peleteiro, J.B. 2001. Engorde de juveniles de besugo, *Pagellus bogaraveo* (Brünich, 1768) cultivados, en tanques y jaulas. Poster. VIII Congreso Nacional de Acuicultura. Santander. Libro de resúmenes del VIII Congreso Nac. Acuicult.: 51-52.

Olmedo, M., F. Linares, B. Álvarez-Blázquez & J.B. Peleteiro. 2002. El cultivo de besugo (*Pagellus bogaraveo*) en España. Una alternativa a los cultivos tradicionales. X Congreso Latinoamericano de Acuicultura. Libro de resúmenes del X Congreso Latinoamericano: 22.

Olmedo, M., Linares, F. & Peleteiro, J.B. 2002. Engorde de juveniles *Pagellus bogaraveo* (Brünich, 1768) cultivados en tanques y jaulas. Bol. Inst. Esp. Oceanogr. 18 (1-4).

Olmedo, M., J.B. Peleteiro, R. Cal & F. Linares. 2003. Crecimiento de juveniles de lenguado (*Solea senegalensis*, KAUP, 1858) en Galicia. Libro de resúmenes del IX Congreso Nacional de Acuicultura. 2003. Pp: 383-385

Olmedo M., F. Linares & J.B. Peleteiro 2004 Últimos avances en el cultivo del besugo (*Pagellus bogaraveo*) en aguas de Galicia (NW de España). Resumos do Seminario Aquacultura e Novas Espécies. Funchal. Madeira

Peleteiro J.B., M. Olmedo, B. Álvarez Blázquez & F. Linares. 2002. Reproduction of blackspot seabream, *Pagellus bogaraveo* B., in captivity. Aquaculture Europe 2002. European Aquaculture Society. Special publication N°. 32: 424-425.

**INCIDENCIAS DE DESARROLLO**

La aparición en el agua de hidrocarburos tras el hundimiento del Prestige en Cantabria, obligó a interrupciones en el suministro de agua, lo cual conllevó a cambios de los ciclos de alimentación que pudo influir en la reproducción, cría larvaria y estado general de los ejemplares.

**BIBLIOGRAFÍA****CO de Santander**

Chereguini O., C.A. Fernández Pato & C. Martínez Tapia. 1990 Growth of wild black-spot sea bream (*Pagellus bogaraveo* B.) from Cantabrian Sea under laboratory conditions: Some interesting parameters. ICES. C.M. F:32

Fernández Pato C.A., C. Martínez Tapia, O. Chereguini & García Banda 1990. Spawn, hatching and larvae rearing of black spot sea bream (*Pagellus bogaraveo* B.) first experiences in the Oceanographic Center of Santander (Spain) in order to its culture. ICES, C.M.F:30.

Fernández Pato, C., C. Martínez Tapia & O. Chereguini. 1993. Black-spot seabream culture (*Pagellus bogaraveo* B.): current state of research. From Discovery to Commercialization. Abstracts of contributions presented at the International Conference World Aquaculture'93. European Aquaculture Society. Special publication N°19, pp362.

Guillaume J., S.Kushik, P. Bergot & R. Métailler. Nutrición y alimentación de peces y crustáceos. Ed. Mundi-Prensa Madrid 2004 475 pp.

Lovell T. Nutrition and feeding of fish. AVI Book New York, 1998. 260 pp.

Martínez Tapia, C., C. Fernández Pato & O. Chereguini. 1990 Comparative study of larvae survival and growth in sea bream (*Pagellus bogaraveo* B.) using microencapsulated or living-food ICES., C.M.:F:31.

Martínez Tapia, C., C. Fernández Pato, A. Sanchón, V. Mazorra & J. Gómez. 2000. Culture of black spot Seabream (*Pagellus bogaraveo* B.): Parameters of growth to market size, effect of different temperature and diets. International Conference AQUA 2000. European Aquaculture Society. Special publication N° 28, pp.449.



Recommended Dietary Allowances. 10 th Edition. National Academy Press, Washington, 1989. 284 pp.

### **Universidad de Oviedo. Genética**

Chakraborty, R.; Haag, M.; Ryman, N.; y Stahl G. 1982. Hierarchical gene diversity analysis and its application to brown trout populations data. *Hereditas*. 97: 17-21.

Danzmann, R.G. 1997. PROBMAX: a computer program for assigning unknown parentage in pedigree analysis from known genotypic pools of parents and progeny. *Journal of Heredity*. 88: 333.

Goodman S.J. 1997. RST CALC: A collection of computer programs for calculating unbiased estimates of genetic differentiation and determining their significance for microsatellite data. *Molecular Ecology*. 6: 881-885.

Goudet, J. 2001. FSTAT, a program to estimate and test gene diversities and fixation indices (version 2.9.3).

Available from <http://www.unil.ch/izea/software/fstat.html>

Queller, D.C.; y Goodnight, K.F. 1989. Estimating relatedness using genetic markers. *Evolution*. 43: 258-275.

Raymond, M.; y Rousset, F. 1995. GENEPOP (version 1.2): population genetics software for exact tests and ecumenicism. *Journal of Heredity*. 86: 248-249.

Slate. J.; Marshall, T.; y Pemberton, J. 2000. A retrospective assessment of the accuracy of the paternity inference program CERVUS. *Molecular Ecology*. 9: 801-808.

Swofford, D.L.; y Selander, B. 1989. BIOSYS-1: A FORTRAN program for the comprehensive analysis of electrophoretic data in populations genetics and systematics. *Journal of Heredity*. 72: 282-302.

Walsh P.S.; Metzger D.A. & Higuchi R. 1991. Chelex 100 as a medium for simple extraction of DNA for PCR-based typing from forensic material. *Biotechniques*, 10: 506–513.

## **CIMA**

Blight, E.G. & W.J.Dyer. 1959. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can.J. Biochem. Physiolog.*, 37:911-917.

Bradford, M.M. 1976. A rapid sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry* 72, 248-254.

Fernández-Reiriz, M.J., A. Pérez-Camacho, M.J. Ferreiro, J. Blanco, M. Planas, M.J. Campos & U. Labarta. 1989. Biomass production and variation in the biochemical profile (totalprotein, carbohydrates, RNA, lipids and fatty acids) of seven species of marine microalgae. *Aquaculture*,83:17-37.

Lepage, g. & C. Roy. 1986. Direct transesterification of all classes of lipids in a one-step reaction. Notes on methodology. *Journal of lipid Research*, 27: 114-120.

## **CIMA y CO de Vigo**

Chereguini, O, Fernández-Pato, C.A. & Martínez Tapia, C., 1990. Growth of wild black-spot seabream (*Pagellus bogaraveo*. B) From Cantabrian sea under laboratory conditions. Some interesting parameters. ICES CM 1990/F32.

Fernández Pato, C.A, Martínez-Tapia, C., Chereguini, O., & García-Banda, I.,1990. Spawn, Hatching, and larvae rearing of black-spot sea bream (*Pagellus bogaraveo* B.) First experiences in the Oceanographic Center of Santander (Spain) in order to its culture. ICES CM 1990/F30.

Genovese L., Micale, V., Patti, F & Greco, S. 1998. Growth performance of *Pagellus bogaraveo* reared at different stocking densities. In : 33 International Symposium on New Species for Mediterranean Aquaculture. Book of abstracts. 22-24 april, Alghero. Italy

Greco, S., Cavaliere, A., Lo Paro, G., Manganaro, A. & Sturniolo, G., 1989. Effetti di diete bilanciate nell'allevamento intensivo di *Pagellus bogaraveo* (Rovello). OEBAIA 1989. Vol. XV-2, N.S.: 637-644.

Krug, H.M., 1986. Reproduction of the blackspot seabream, *Pagellus bogaraveo* (Bruennich, 1768) in Azorean waters. ICES CM 1986/G61.

Krug, H.M., 1989. The Azorean blackspot seabream, *Pagellus bogaraveo* (Bruennich, 1768) (Teleostei: Sparidae): Age and growth. CYBIUM 3E-SER 1989 Vol.13, (4): 347-355.

Krug, H.M., 1990. The Azorean blackspot seabream, *Pagellus bogaraveo* (Bruennich, 1768) (Teleostei, Sparidae). Reproductive cycle, hermaphroditism, maturity and fecundity. CYBIUM.1990. vol 14 (2): 151-159.

Linares F., M. Olmedo, A. Ortega & J.B. Peleteiro. 1999. Experiencias de engorde de besugo, *Pagellus bogaraveo* (Brünich, 1768) en jaulas y tanques de cultivo. Libro de resúmenes del VII Congreso Nac. Acuicult.: 52.

Linares F., M. Olmedo, J.B. Peleteiro & C. Gianzo.2000. Biochemical composition of blackspot sea bream, *Pagellus bogaraveo*, throughout larval development. Initial results. Poster. AQUA 2000. World Aquaculture 2000. Niza (Francia). European Aquaculture Society. Special publication nº 28: 400.

Linares,F., M.Olmedo, J.B.Peleteiro& A.Ortega. 2000. Composición lipídica el besugo(*Pagellus bogaraveo*) procedente del medio natural y de cultivo intensivo. Resultados preliminares. Poster. V Congreso de Ciencias del Mar. Marcuba 2000. La Habana (Cuba).

Martínez-Tapia, C., Fernández-Pato, C. & Chereguini, O., 1990. Comparative study of larvae survival and growth in sea bream (*Pagellus bogaraveo* B) using microencapsulated of living-food. ICES C.M. 1990/F31.

Micale, V, Maricchiolo, G. & Patti, F., 1995. Osservazioni sul ciclo sessuale di rovello *Pagellus bogaraveo* (Brunnich, 1768) allevato in cattività. Atti 56° Congresso Unione Zoologica Italiana, Reggio Calabria 2-7 Ottobre 1995.

Micale, V. & Patti, F., 1997. Accrescimento ed efficienza di conversione in *Pagellus bogaraveo* sottoposto a differenti regimi fotoperiodici. Atti XXVII Congresso Società Italiana di Biologia Marina, Biologia Marina Mediterranea, 4(1) : 330-331.

Olmedo, M., Linares, F., Ruiz, N., Álvarez-Blázquez, B., Peleteiro, J.B., Ortega, A., & Rodríguez, J.L., 1997. Preemgorde de alevines de besugo (*Pagellus bogaraveo* B.) Nacidos en cautividad. Actas VI Congreso Nacional Acuicultura. Cartagena 1997 :879-885.

Olmedo, M., Peleteiro, J.B., Álvarez-Blázquez, B. & Gómez, C., 1998. First experiences with larval culture of blackspot sea bream (*Pagellus bogaraveo*). ICES CM 1998/L21.

Olmedo M., J.B. Peleteiro, F. Linares, B. Álvarez-Blázquez, C. Gómez & A. Ortega. 1999. Experience with ongrowing juvenile blackspot sea bream (*Pagellus bogaraveo*) born in captivity, in tanks at differents temperatures. Poster. TECAM. Seminar on Mediterranean Marine Aquaculture Fifish Species Diversification. 24-27 May 1999.

Olmedo M., J.B. Peleteiro, F. Linares, B. Álvarez-Blázquez, C. Gómez & A. Ortega. 2000. Experience with ongrowing juvenile blackspot sea bream (*Pagellus bogaraveo*) born in captivity, in tanks at differents temperatures. CIHEAM. FAO. Cahiers options méditerranéennes, Vol. 47:153-156.

Patti, F. & Micale, V., 1993. Effects of different photoperiods on melanomacrophage centres of *Pagellus bogaraveo* (Brunnich, 1768). In: "From discovery to commercialization" (M.Carrillo, L. Dahle, J.Morales, P. Sorgeloos, N. Svennevig & J. Wyban, cpls.), European Aquaculture Society Special Publication No 19, Ostende (Belgium). p.429.

Peleteiro, J.B., Olmedo, M., Cal, R.M. & Gómez, C., 1994. Growth under laboratory conditions of wild juvenile black-spot sea bream (*Pagellus bogaraveo* B.). *Aquaculture Europe*. 1994 18 (4), 6-10.

Peleteiro, J.B., Olmedo, M., Gómez, C. & Álvarez-Blázquez, B., 1997. Study of reproduction in captivity of blackspot sea bream (*Pagellus bogaraveo* B.). Embryonic development and consumption of vitelline sac. ICES CM 1997/HH19

Peleteiro J.B., M. Olmedo, C.Gómez & B. Álvarez-Blázquez. 1999 a. Evaluación de nuevas especies de peces potencialmente cultivables: Besugo (*Pagellus bogaraveo* B.), Salmonete (*Mullus surmuletus*), Sargo (*Diplodus sargus*), Mojarra (*Diplodus vulgaris*), Abadejo (*Pollacus pollacus*), Aligote (*Pagellus acarne*), en el NW de la Península Ibérica. Libro de resúmenes del VII Congreso Nac. Acuicult.: 51.

Peleteiro J.B., M. Olmedo & B. Álvarez-Blázquez. 1999 b. Culture of *Pagellus bogaraveo*: present knowledge, problems and perspectives. Seminar on Mediterranean Marine Aquaculture Finfish Species Diversification. CIHEAM-IAMZ. Zaragoza, mayo 1999.

Peleteiro J.B., M. Olmedo & F. Linares. 2000. Recent advances in the cultivation techniques for blackspot seabream (*Pagellus bogaraveo*): Perspectives for industrial cultivation. Ponencia. Workshop on New Species for Aquaculture. Faro (Portugal).

Peleteiro J.B., M. Olmedo, B. Álvarez Blázquez, F. Linares & F.J. Urbietta. 2000. Blackspot seabream (*Pagellus bogaraveo*, B.): a valid alternative to turbot (*Scophthalmus maximus*) culture?. Poster. AQUA 2000. World Aquaculture

2000. Niza (Francia). European Aquaculture Society. Special publication nº 28: 551.

Peleteiro J.B., M. Olmedo and B. Álvarez-Blázquez. 2000. Culture of *Pagellus bogaraveo*: Present knowledge, problems and perspectives. CIHEAM. FAO. Cahiers options méditerranéennes, Vol. 47: 141-151.

Sanchez, F., 1982. Preliminary fishing and biological data about red sea-bream (*Pagellus bogaraveo* B.) in the Cantabrian Sea (N.Spain). ICES C.M. 1982/G:39.

Sanchez, F., 1993. Las comunidades de peces de la plataforma del Cantábrico. Publicaciones Especiales del Inst. Esp. de Oceanografía, nº 13:137 pp.

#### **ANDALUCÍA. Universidad de Granada**

De la Herrán, R., Ruiz Rejón, C., Ruiz Rejón, M., Garrido-Ramos, M. 2001. The molecular phylogeny of the Sparidae (Pisces, Perciformes) based on two satellite DNA families. *Heredity* 87: 691-697.

Garrido-Ramos, M.A.; De la Herrán, R.; Jamilena, M.; Lozano, R.; Ruiz Rejón, C.; Ruiz Rejón, M. 1999. Evolution of centromeric satellite DNA and its use in phylogenetic studies of sparidae family (Pises, Perciformes). *Mol. Phylogenet. Evol.* 12: 200-204.

Garrido-Ramos, M.; De la Herrán, R.; Ruiz Rejón, C.; Ruiz Rejón, M. 1998. A satellite DNA of the Sparidae family (Pisces, Perciformes) associated with telomeric sequences. *Cytogenet. Cell Genet.* 83: 3-9.

Kumar, S.; Tamura, K.; Jakobsen, I. B.; Nei, M. 2001 MEGA2: Molecular Evolutionary Genetics Analysis software, Arizona State University, Tempe, Arizona, USA

Nei, M. 1987. Molecular evolutionary genetics. Columbia Press, New York.

Sambrook, J.; Fritsch, E.F.; Maniatis, T. 1989. Molecular cloning. A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.

Thompson, J.D., Gibson, T.J., Plewniak, F., Jeanmougin, F. and Higgins, D.G. 1997. The ClustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. Nucleic Acids Research, 24:4876-4882.