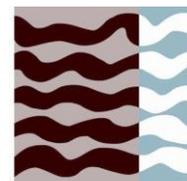




Universidad  
Politécnica  
de Cartagena



**Escuela Técnica Superior de  
Ingeniería Agronómica**



**ETSIA**

**Grado en Ingeniería Agroalimentaria  
y de Sistemas Biológicos**

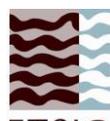
MEJORA DE LA COMPETITIVIDAD DEL SECTOR DE  
LA DORADA A TRAVÉS DE LA SELECCIÓN  
GENÉTICA (PROGENSA-III): RESISTENCIA A  
PHOTOBACTERIUM DAMSELAE

Autora: Doña Clara Fernández García

Dirección: Doña Eva Armero Ibáñez

Codirección: Don Antonio Vallecillos Quijada

Cartagena, abril de 2020



## Declaración de Honestidad Académica

La alumna Dña. **Clara Fernández García**, con DNI **23303837F**,

como autora del TFE de título **Mejora de la competitividad del sector de la dorada a través de la selección genética (PROGENSA-III): RESISTENCIA A PHOTOBACTERIUM DAMSELAE**

dirigido por Dña. **Eva Armero Ibáñez**

para la obtención del título

- Grado en Ingeniería Agroalimentaria y de Sistemas Biológicos
- Máster Universitario en Ingeniería Agronómica
- Máster Universitario en Técnicas Avanzadas en Investigación y Desarrollo Agrario y Alimentario

### DECLARA:

- Que el mencionado TFE es íntegramente de su autoría.
- Que se trata de un trabajo original e inédito en el que no existe plagio.
- Que en todo momento se respeta la propiedad intelectual y en ningún caso se han utilizado como propios resultados ni materiales obtenidos o generados por otros autores.
- Que los resultados y materiales realizados por otros autores han sido debidamente identificados en la memoria.
- Que se ha aplicado al texto íntegro del TFE el control antiplagio que establece la *Normativa de Trabajos Fin de Estudios en la ETSIA*, y acompaña esta declaración de las páginas primera y última del informe obtenido de Turnitin a través de Aul@Virtual.
- Qué los directores del TFE conocen y han dado el visto bueno a los resultados del control antiplagio y, en su caso, han informado en la forma que indica el documento *Política de Calidad y Código de Buenas Prácticas*.

Y para que así conste, firma la presente declaración en,

Cartagena, a 19 de abril de 2020



---

Fdo. Clara Fernández García

# Turnitin Informe de Originalidad

Procesado el: 19-abr-2020 20:51 CEST

Identificador: 1301685387

Número de palabras: 16897

Entregado: 1

tfg-fer-mej Por CLARA FERNANDEZ GARCIA

Índice de similitud  <span style="font-size: 2em;">9%</span>	<b>Similitud según fuente</b>	
	Internet Sources:	9%
	Publicaciones:	0%
	Trabajos del estudiantar:	5%

[incluir citas](#)
[incluir bibliografía](#)
[excluyendo las coincidencias < 25 de las palabras](#)
 modo: ver informe en vista quickview (vista clásica)
Change mode
[imprimir](#)
[descargar](#)

3% match (Internet desde 09-mar.-2016)

<http://proyectos-mapa.tragsatec.es>

2% match (Internet desde 08-sept.-2016)

<http://docplayer.es>

2% match (Internet desde 07-jun.-2019)

<http://www.apomar.es>

1% match (Internet desde 03-mar.-2011)

<http://www.fao.org>

<1% match (trabajos de los estudiantes desde 13-mar.-2020)

[Submitted to Universidad Politécnica de Madrid on 2020-03-13](#)

<1% match (Internet desde 03-abr.-2019)

<http://eprints.uanl.mx>

<1% match (Internet desde 06-jun.-2018)

<http://www.mispecies.com>

<1% match (Internet desde 10-abr.-2019)

<http://www.revistaaquatic.com>

<1% match (trabajos de los estudiantes desde 13-mar.-2018)

[Submitted to Universidad de Alicante on 2018-03-13](#)

<1% match (Internet desde 15-dic.-2011)

<http://www.slideshare.net>

<1% match (trabajos de los estudiantes desde 24-feb.-2020)

[Submitted to Universidad de Salamanca on 2020-02-24](#)

<1% match (Internet desde 03-abr.-2020)

<https://repositorio.upct.es/handle/10317/7919?locale-attribute=en>

<1% match (Internet desde 02-may.-2016)

<http://www.biblioteca.uma.es>

## TABLA DE CONTENIDO

RESUMEN.....	4
ABSTRACT .....	5
<b>1. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>6</b>
<b>1.1. Situación en el sector acuícola .....</b>	<b>6</b>
1.1.1. Producción acuícola mundial.....	6
1.1.2. Producción acuícola en Europa .....	7
1.1.3. Producción acuícola en España.....	9
<b>1.2. Sistema de producción en Dorada .....</b>	<b>10</b>
1.2.1. Rasgos biológicos .....	10
1.2.2. Ecología y hábitat.....	11
1.2.3. Parámetros reproductivos .....	12
1.2.4. Sistemas de cría .....	15
<b>1.3. Principales enfermedades en dorada .....</b>	<b>18</b>
<b>1.4. PROGNSA III .....</b>	<b>21</b>
<b>2. OBJETIVOS .....</b>	<b>22</b>
<b>3. MATERIAL Y MÉTODOS.....</b>	<b>22</b>
<b>3.1. Producción de una nueva generación a partir de puestas masales de una población de reproductores.....</b>	<b>22</b>
<b>3.2. Respuesta a la infección del patógeno <i>Photobacterium damsela</i> y subespecie piscicida. ....</b>	<b>25</b>
<b>3.3. PCR multiplex de marcadores microsatélites. Asignación de parentescos .....</b>	<b>27</b>
<b>3.4. Análisis de frecuencia poblacional, mediante GenAlex. ....</b>	<b>30</b>
<b>3.5. Análisis estadístico.....</b>	<b>31</b>
<b>4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....</b>	<b>32</b>
<b>4.1. Establecimiento de líneas genéticas.....</b>	<b>32</b>
<b>4.2. Caracterización genética de la población a través de marcadores microsatélites. Asignación de parentescos.....</b>	<b>33</b>
<b>4.3. Respuesta a la infección del patógeno <i>Photobacterium damsela</i> subespecie <i>piscicida</i>.....</b>	<b>40</b>
<b>4.4. Análisis del efecto padre y madre. ....</b>	<b>42</b>
<b>4.5. Estudio técnico – económico sobre la creación de una línea genética resistente.....</b>	<b>44</b>
<b>5. CONCLUSIONES.....</b>	<b>46</b>
<b>6. BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>48</b>

7. ANEXO: EFECTO PADRE/MADRE SOBRE LA MORTALIDAD EN LA POBLACIÓN MURCIA.....	50
8. ANEXO: EFECTO PADRE/MADRE EN LA POBLACIÓN AND_CAN .....	57
9. ANEXO: Tabla chi cuadrado para los parentales AND-CAN .....	61
10. ANEXO: Tabla chi cuadrado para los parentales MUR .....	62

## ÍNDICE DE FIGURAS

Ilustración 1. Evolución del crecimiento mundial interanual de los niveles productivos acuícolas en el periodo 1965 – 2016 a partir de datos recogidos por la FAO.....	6
Ilustración 2. Distribución de la producción de pescado de acuicultura en los Estados miembros de la Unión Europea por su volumen (toneladas) y valor (millones de euros) (FAO, 2016).....	8
Ilustración 3. Evolución del valor de la producción de la acuicultura en España, en millones de euros por especies, en el periodo 1987-2017 (FAO) .....	9
Ilustración 4. Evolución de la producción (toneladas) de pescados marinos de acuicultura en España en el periodo 1990-2018.....	10
Ilustración 5 Imagen de perfil de Sparus aurata (FAO).....	10
Ilustración 6. Dorada con 18 días de vida    Ilustración 7. Dorada con 27 días de vida	13
Ilustración 18. Ejemplo de electroferograma para todos los microsatélites.....	34
Ilustración 16. Variación de supervivencia respecto al origen. ....	41
Ilustración 17. Efecto de la infección en los individuos en función del peso.....	41

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1 Los componentes y las concentraciones relativas de la PCR utilizada en Lee-Montero et al., (2013). .....	28
Tabla 2. Microsatélites de la SuperMultiplex en dorada (SMsa1): código interno, nombres de locus, grupo de ligamiento (LG), número de acceso en GenBank (GENBANK), fluorocromo, motivo de nucleótido y concentración de cebador para cada marcador de microsatélite.....	29
Tabla 3. Expresión de los parámetros relacionados con la heterocigosidad en el programa GenAlex (v.6.5).....	31
Tabla 4. Peso promedio del lote de reproductores y descendientes a los 247 días post-eclosión .....	32
Tabla 5. Peso promedio de los progenitores por origen y sexo.....	33
Tabla 6. Talla promedio de los progenitores por origen y sexo .....	33
Tabla 7. Información genética de la SuperMultiplex (SMsa1) en los reproductores del núcleo MUR.....	36
Tabla 8. Información genética de la SuperMultiplex (SMsa1) en los descendientes de MUR.....	36
Tabla 9. Información genética de la SuperMultiplex (SMsa1) en los reproductores del núcleo AND-CAN.....	37
Tabla 10. Información genética de la SuperMultiplex (SMsa1) en los descendientes de AND-CAN.....	37
Tabla 11. Variación del número de alelos por microsatélite para MUR de los progenitores y los descendientes.....	38
Tabla 12. Variación del número de alelos por microsatélite para AND-CAN de los progenitores y los descendientes .....	38
Tabla 13. Ejemplo de genotipo para una familia. ....	39
Tabla 14. Niveles de IgM y peroxidasa atendiendo a la susceptibilidad de la infección. ....	42
Tabla 15. Los progenitores AND-CAN con menor tasa de mortalidad en sus descendientes.....	43
Tabla 16. Los progenitores MUR con menor tasa de mortalidad en sus descendientes .....	44
Tabla 17. Distribución de costes para una explotación de engorde de 1500 t de dorada en jaula.....	45
Tabla 18. Distribución de costes para una explotación de engorde de 1950 t de dorada en jaula.....	45
Tabla 19. Beneficios para ambas producciones, con selección y sin selección. ....	46

## RESUMEN

La producción acuícola de dorada en España tiene una importancia creciente en el sector alimentario a nivel nacional e internacional, con un ritmo de desarrollo entre el 6 y 8 % anual. El presente Trabajo Fin de Grado se enmarca dentro del proyecto PROGENSA III cuyo fin es la mejora de la competitividad del sector acuícola productor de dorada mediante un proceso de selección genética. En este trabajo, en particular, se pretende establecer una línea genética resistente al patógeno *Photobacterium damsela* (subespecie *piscicida*). Para ello, se establecieron dos líneas genéticas a partir de puestas masales de dos poblaciones de reproductores con diferente origen de procedencia, Andalucía y Canarias (AND-CAN) y Murcia (MUR), además los reproductores AND-CAN habían sido sometidos a procesos de selección de crecimiento y ausencia de malformaciones. Estas líneas genéticas y sus descendientes fueron caracterizadas fenotípicamente, para el peso y la talla, y genéticamente a través de 11 marcadores microsátélites. Las heterocigosidades observadas en las poblaciones de los descendientes descendieron ligeramente respecto a las poblaciones de los reproductores respectivas, pero en cualquier caso mostraron valores elevados (0,75).

Los descendientes de ambas líneas fueron infectados con *Photobacterium damsela*, observándose un efecto del origen sobre la resistencia a la enfermedad. En la línea AND-CAN presentó unos porcentajes de supervivencia de casi un 70 %, y casi una diferencia de un 10 % respecto a la población proveniente de la línea MUR. Además, se observó que la mortalidad descendía a partir de los 20 gramos de peso de los alevines.

Por otro lado, en lo que respecta al efecto genético padre/madre sobre la supervivencia de la descendencia se observó un efecto significativo por lo que parece ser un carácter que se pueda mejorar mediante selección genética. Además, si tenemos en cuenta que la selección que se realiza actualmente es a favor de crecimiento, esto supondría una doble ventaja a la hora de buscar una línea genética resistente a *Photobacterium*.

En el estudio económico realizado, se muestra como un incremento en la producción de un 30% usando líneas genéticas más resistentes a *Photobacterium* supone incrementar el beneficio económico en más del doble del valor inicial.

En conclusión, profundizar en el marco PROGENSA en la búsqueda de líneas genéticas en dorada que además de sus mejores caracteres de crecimiento sean resistentes a *Photobacterium damsela* es de gran interés tanto por el beneficio económico que supone como por la reducción de impacto ambiental que puede conllevar.

## ABSTRACT

Aquaculture production in Spain is a well-known industrial activity, being particularly significant the field of gilthead seabream breeding (*Sparus aurata*). The genetic improvement Project PROGENSA, the one in which our current study is contained, has as its main target the development of several studies concerning the genetic enhancement of gilthead seabream populations. This concrete study specializes itself in the development of two genetic lines with two different procedences, the genetic characterisation of the new generations through the utilization of microsatellite markers, the study of the resistance parameters of both the two batches, and, at last, an economic analysis of the impact in the fish industry.

There have been considered two groups of biological parents which have generated the offspring; being denominated as AND\_CAN\_F2 and MUR\_F0. The first group come from the ULPGC and IFAPA facilities but raised in the IFAPA installations, where the specimens went through several processes of selection of growth and absence of malformations. The second group comes from the IEO facilities and has been through any genetic selection process.

Differences have been found between both procedences in terms of resistance aptitude. Descendants from the IFAPA nucleus showed strong characteristics of greater aptitude than the CORE of the MURCIA nucleus, being in the first case, a mortality rate of almost 30%, while in the other batch it has been almost 40%.

It is also an important factor the influence between the weight variable and susceptibility to infection. This has resulted in higher mortality in individuals included in a weight range from 10 to 20 grams.

Family contributions permitted quite an advancement, especially in the IFAPA nucleus. This one represented greater ability to generate a higher number of offspring, which also may carry a considerably lower mortality rate.

The economic analysis was quite explanatory; it has been proved how the Benefit could double itself if the resistant genetic line was included for future productions, as was the case with IFAPA (only 30 % of mortality).

## 1. INTRODUCCIÓN

### 1.1. Situación en el sector acuícola

#### 1.1.1. Producción acuícola mundial

En las cuatro últimas décadas, los niveles de producción acuícola han ascendido, revelando la capacidad de innovación y aprovechamiento de recursos sostenibles por parte del mercado empresarial. Por ello, este sector continuará generándose un avance de carácter exponencial en su consolidación en el mundo, suponiendo un beneficio incluso para países en vías de desarrollo. Cabe destacar que la acuicultura está siendo una vía de desarrollo económico y social, haciéndose camino en el tercer mundo y fomentando un descenso de pobreza y desnutrición, incrementando ingresos de las familias y facilitando el comercio entre países a nivel nacional e internacional, proveyendo divisas y generando posibilidades de empleo (procesos destinados a la producción, transporte, empaquetado, etc).

Según los datos estadísticos recogidos por la FAO, a lo largo del siglo XX hasta la actualidad, la actividad productiva acuícola ha mantenido un ascenso exponencial a excepción de un ligero decaimiento en los últimos años (Ilustración 1). A pesar de este descenso, el sector continúa con un ritmo de crecimiento entre el 6 y 8 % anual, y alcanzando unos niveles de producción de 110'2 millones de toneladas en 2016, proporcionando un beneficio de más de 194'8 millones de euros (APROMAR, 2018)

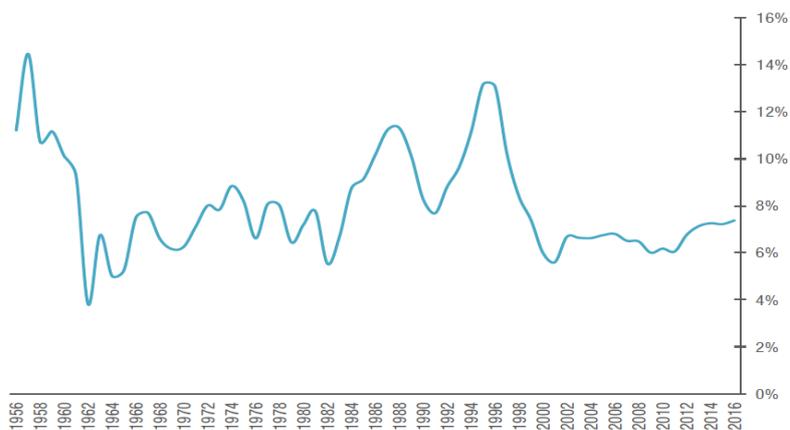


Ilustración 1. Evolución del crecimiento mundial interanual de los niveles productivos acuícolas en el periodo 1965 – 2016 a partir de datos recogidos por la FAO

Cabe destacar que la acuicultura se fomenta de forma más considerable en países en vías de desarrollo, si se hace una comparativa con los países desarrollados. Actualmente, los principales países productores proceden de Asia, carentes de una nutrición apropiada y con nivel adquisitivo precario. El país productor líder sigue siendo China con una producción acuícola mundial de 63'7 millones de toneladas, seguido de Indonesia, productor de 16'6 millones de toneladas, siendo la diferencia bastante apreciable entre ambos países. Sin embargo, este rango productivo tan potente de China no se debe precisamente a su extensión costera, ya que es prácticamente insignificante comparándola con Europa o Canadá (sólo el 4% del litoral costero mundial). A pesar de esto último, el liderato de producción acuícola lo presenta China, con una antiquísima cultura de consumo de productos acuáticos, así como el desarrollo de técnicas y tecnologías desde tiempos previos a cualquier otro país.

#### 1.1.2. Producción acuícola en Europa

Por otro lado, y valorando Europa como potencia productora, se puede afirmar que en ésta se realiza una provechosa labor gracias a su extensión costera, derivando en unas significantes producciones de pescado marino y de agua dulce. Con alrededor de 55.000 km de costa, es la segunda línea costera más extensa del mundo, seguido de Canadá, ofreciendo además unas condiciones ambientales físicas y oceanográficas óptimas para la acuicultura. Además de las características ambientales y geográficas propicias, los estados miembros de la Unión constan de fuertes entidades empresariales para avances de tecnología e investigación, con recursos humanos propiciamente formados que generan un fuerte avance productivo en este sector, siendo este una actividad sostenible desde el punto de vista medioambiental, económico y ofreciendo un mercado alimentario sano, de calidad y seguro (APROMAR, 2018).

Según APROMAR (2018), en la Unión Europea se produjeron en 2016 un total de 6.556.680 toneladas de productos acuáticos, siendo este el dato más reducido en los últimos años (reducción de un 1,5 %). Por otro lado, el consumo de estos productos en 2017 ha sido de 12,7 millones de toneladas (9,4 millones procedentes de importación), posicionando a Europa como el mercado más fuerte. En los hogares españoles, un porcentaje del 13,2 % de la compra destinada a alimentación fue dirigida a productos acuáticos, con un gasto per cápita anual de 203,3 euros y un consumo de 24,8 kg por persona.

La principal especie de pescado producida en Europa es, indudablemente, la trucha arco iris (*Onchorynchus mykiss*), de la que se recogen datos de producción de 185.400 toneladas. El segundo lugar lo ocupa el salmón atlántico (*Salmo salar*), con 181.030 toneladas, y finalmente y, en tercer lugar, la dorada (*Sparus aurata*) con 83.186 toneladas producidas y sin fluctuaciones en ventas.

En 2016, Reino Unido se posiciona como el Estado miembro de la UE líder de productor de productos acuícolas (177.604 toneladas), obteniendo un total de 880'3 millones de euros (Ilustración 2). A Reino Unido le sigue Grecia con 99.994 toneladas (el 14,5 % del total y un crecimiento del 13,2%) y 457,3 millones de euros (16,0 % del total y un crecimiento del 10,2%), con una producción mayoritariamente enfocada en lubina y dorada. Por último, España es el tercero en la escala, con 64.111 toneladas (9,3% del total y un crecimiento del 3,7%) y 322,6 millones de euros (el 11,3% del valor total, suponiendo un crecimiento del 11,5 %).

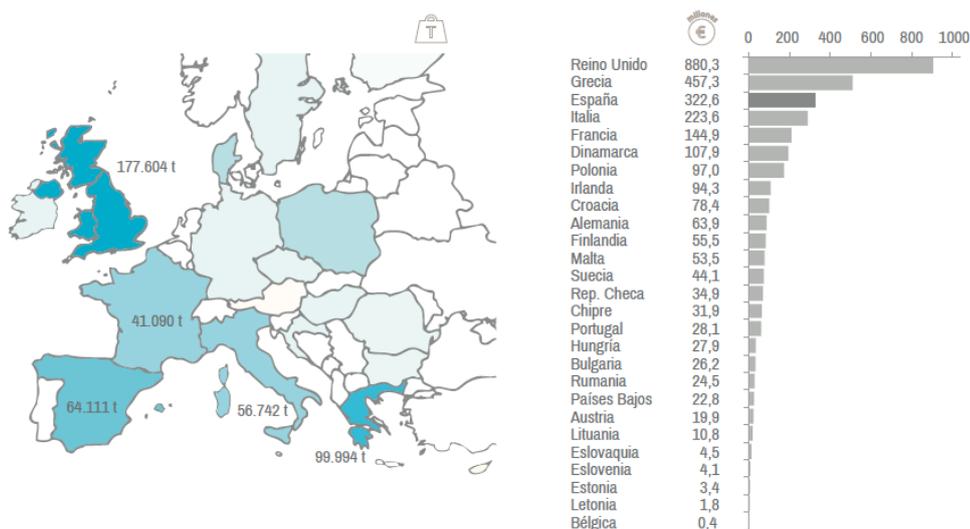


Ilustración 2. Distribución de la producción de pescado de acuicultura en los Estados miembros de la Unión Europea por su volumen (toneladas) y valor (millones de euros) (FAO, 2016).

Por otro lado, es interesante resaltar que los requerimientos biológicos de la lubina y la dorada son prácticamente idénticos. Es por ello por lo que se recogen datos conjuntos de ambos especímenes, ya que en numerosas ocasiones se crían en las mismas granjas y pueden intercambiarse entre las mismas. De acuerdo con lo anterior, los

últimos análisis realizados por APROMAR y FAO de 2017 estimaron 399.724 toneladas de ambas producciones a nivel europeo.

### 1.1.3. Producción acuícola en España

La producción de dorada en España en 2017 fue 13.643 toneladas, obteniendo un valor de comercialización de 66'4 millones de euros, lo que representa un ligero descenso con respecto a su valor en 2016. El precio de primera venta en 2017 fue de 4,87 euros/kg.

Además, en España presentan un mismo nivel de producción o similar, la lubina, el rodaballo, el mejillón, almejas, ostras y abalones, principalmente (Ilustraciones 3 y 4). Por otro lado, con un nivel productivo inferior, se encuentra la cría de anguila, besugo, microalgas y macroalgas.

La cría de peces marinos en España se ha visto incrementado notablemente desde finales de los años ochenta hasta el 2015 aproximadamente. Su producción se vio alzada desde prácticamente cantidades mínimas hasta alrededor de 47.000 toneladas en el 2009. Sin embargo, a partir de este punto cúlmine, los niveles se han visto estancados y estabilizados, llegándose a aproximar a las 51.000 toneladas en 2018.

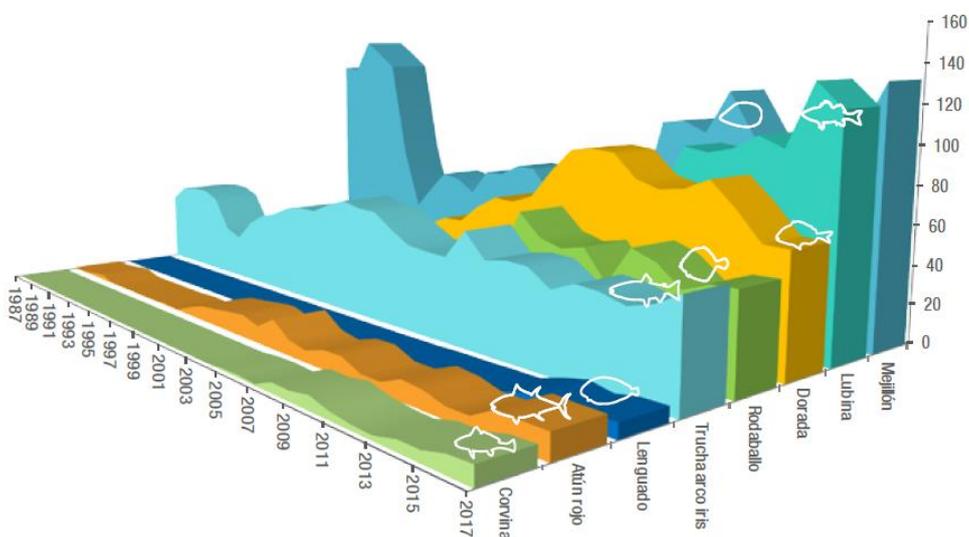


Ilustración 3. Evolución del valor de la producción de la acuicultura en España, en millones de euros por especies, en el periodo 1987-2017 (FAO)

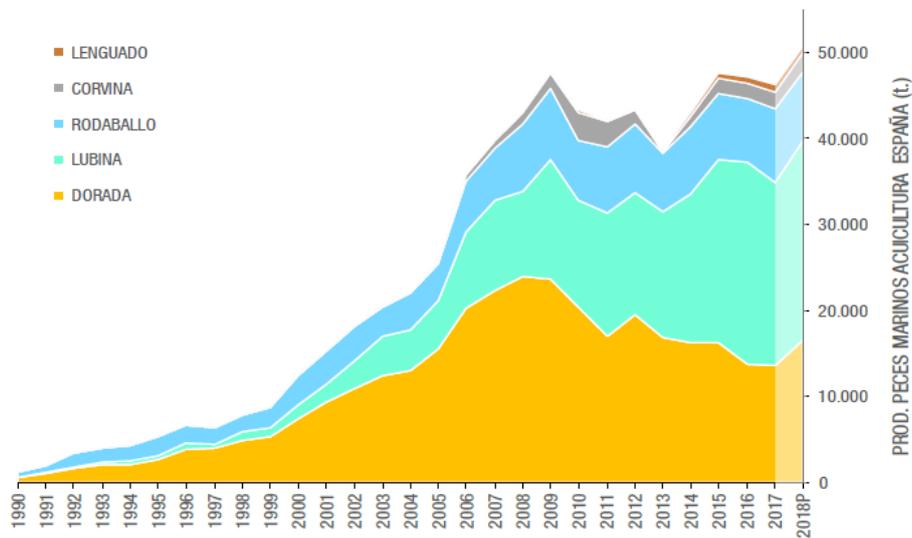


Ilustración 4. Evolución de la producción (toneladas) de pescados marinos de acuicultura en España en el periodo 1990-2018.

## 1.2. Sistema de producción en Dorada

### 1.2.1. Rasgos biológicos

La especie dorada, *Sparus aurata*, es un perciforme perteneciente a la familia de los espáridos, actualmente uno de los productos acuícolas más importantes en el área mediterránea.

Clase: Osteictios

Superorden: Teleósteos

Orden: Perciformes

Familia: Sparidae

Género: *Sparus*

Especie: *Sparus aurata* L

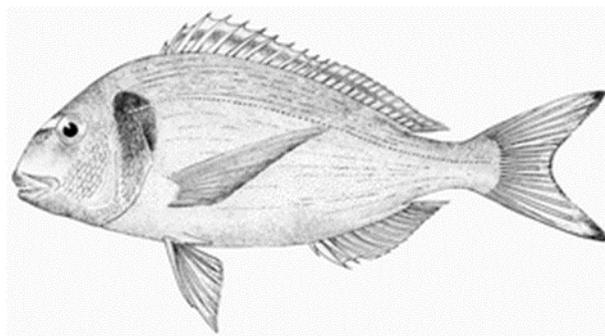


Ilustración 5 Imagen de perfil de *Sparus aurata* (FAO)

Presentan cuerpo oval, profundo y comprimido (ilustración 5). El perfil de la cabeza es curvado, ojos pequeños y boca baja, con una leve oblicuidad. Labios gruesos, con 4-6 dientes anteriores de tipo caninos en cada mandíbula, seguidos por dientes romos que acabarán convirtiéndose en molares, disponiéndose en 2 a 4 filas, siendo las dos filas externas las más fuertes. Las branquias se sitúan sobre el primer arco corto, y puede haber un total de 11 a 13, 7 u 8 inferiores y 5 superiores. La aleta dorsal cuenta con 11 espinas y de 13 a 14 rayos blandos, y la anal con tres espinas y 11 o 12 rayos blandos. Las mejillas son escamosas, al contrario que el preopérculo. Las escamas se sitúan a lo largo de la línea lateral 73 a 85. En cuanto a la coloración, poseen un tono gris plateado, con una gran mancha negra que se extiende desde el origen de la línea lateral hasta el margen superior del opérculo y, a su vez, la rodea abajo un área rojiza. En el área de la cabeza, se distingue una banda frontal dorada entre los ojos bordeada por dos áreas oscuras, formándose con más claridad conforme el individuo se desarrolla. A menudo se presentan líneas longitudinales en los costados del cuerpo, así como una banda oscura sobre la aleta dorsal y la horquilla y las puntas de la aleta caudal están bordeadas en color negro (Ortega, 2008)

### 1.2.2. Ecología y hábitat

La dorada es una especie euriterma y erurihalina que es bastante susceptible a las bajas temperaturas, dejando de alimentarse si la temperatura baja de 12-13 °C, y alcanzando un mínimo letal de 5-7 °C. No obstante, se ha observado que esta especie genera resistencia a temperaturas bastante elevadas, incluso influyendo en su rápido crecimiento a los 25- 26 °C, y siendo capaces de sobrevivir llegando a límites de 32-33 °C. En cuanto al carácter eurihalino, su plasticidad ecológica es muy positiva; soporta condiciones de salinidad variables entre el 3 y el 70 ‰, penetrando en estuarios y lagunas costeras con amplio rango de salinidades. Cabe destacar que es una especie abundante en el Mar Menor de Murcia (Linnaeus, 1758).

Por otro lado, esta especie presenta inclinación a migrar a zonas con fondos rocosos y en presencia de algas, destacando la *Posidonia oceánica*. Cabe destacar que los individuos jóvenes presentan hábitos más litorales, viviendo en fondos de menos de 30 metros, aunque los adultos pueden llegar a 100-150 metros de profundidad. A pesar de su inclinación al gregarismo, pueden encontrarse viviendo en solitario o formando grupos poco numerosos. Sin embargo, en las migraciones reproductivas pueden formar grupos de miles de individuos.

Los alevines de dorada realizan migraciones tróficas en dirección a las lagunas y zonas literales, preferentemente en primavera, manteniéndose en esas áreas hasta mitad de otoño, tornando la dirección hacia zonas más profundas en las que las condiciones ambientales no sean tan extremas como las de las lagunas costeras, en las que se da una temperatura inferior a la de mar abierto. Otro de los motivos por los que se realiza la migración es cuando se adentran en periodos reproductivos, y la dorada encuentra condiciones más propicias (temperaturas entre 14 y 18 °C).

### 1.2.3. Parámetros reproductivos

La dorada hembra empieza el desarrollo gonadal durante el mes de septiembre, preparándose para el desove en invierno, que se producirá a finales de diciembre hasta inicios de enero según estudios realizados en lotes del área mediterránea. El desove, o la producción de gametos, ocurre durante una fase que dura de tres a cuatro meses, en el cual las hembras pueden liberar huevos que alcanzan hasta 0,5 – 2 veces el peso de su cuerpo a través de repetidas puestas. La mayoría de los nutrientes requeridos para producir esta cantidad de huevos provienen del alimento suministrado con complementos de nutrientes que parten de reservas corporales, observándose una alteración consiguiente en la composición corporal.

La larva recién eclosionada posee una longitud aproximada de alrededor de 3 mm de largo, y pesa entre 0,1 y 0,15 mg (véase ilustraciones 6 y 7). Realizan poca actividad física; se limitan a su aletargado movimiento en la superficie del agua. No poseen sentido de la vista, son simétricas y tienen el ano y la boca cerrados. Carecen de demasiados melanóforos en el cuerpo, y el saco vitelino ocupa aproximadamente un tercio de su longitud. Al segundo día se abre el ano y comienza la pigmentación de los ojos, y al tercero aparece la aleta pectoral y, seguidamente, comienza la apertura de la boca. La larva ya es capaz de nadar y desplazarse con vigorosidad, y es capaz de cazar aun sin tener una visión concisa. En el quinto día, el saco vitelino se ha reabsorbido, y al séptimo se alcanza el punto de inanición irreversible. La gota de grasa se reabsorbe sobre el octavo día de vida, con lo que la fase vitelina finaliza; la larva es capaz de nadar y de visualizar con una notable mejoría. (Ortega, 2008)

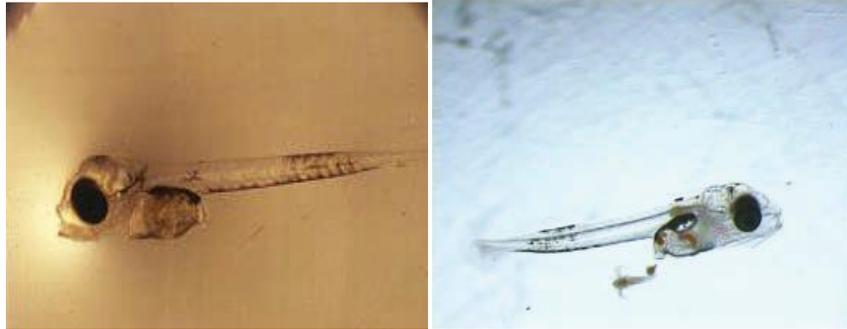


Ilustración 6. Dorada con 18 días de vida    Ilustración 7. Dorada con 27 días de vida

En industria, el desove se realiza en tanques donde se alojan los reproductores. Se debe controlar la proporción de sexos en los tanques ya que se podría exceder la tasa de reversión de sexo establecida socialmente. Por ejemplo, la presencia de machos en la etapa final del desove hace incrementar la cantidad de peces maduros que se convierten en hembras. Del mismo modo, la presencia de hembras crecidas reduce la tasa de reversión de sexo, efecto biológico conocido como hermafroditismo protándrico. Existe una amplia gama de individuos protándricos, tales como *A. schlegelii*, *P. bogaraveo*, *L. calcarifer* y *C. viridis*, siendo en el caso concreto de aquellos especímenes provenientes de la familia de los espáridos maduros sexualmente en los dos primeros años de sus vidas, además de actuar como machos. En el tercer año, un porcentaje de estos realizan su reversión a hembras.

Por otro lado, la situación de *Sparus aurata* es bastante similar; durante los primeros ocho meses de vida, se mantiene dominante la zona dorsal del ovario en la gónada bisexual. Una vez alcanzada la etapa de cría que se inicia alrededor del final del primer año de vida, se formará el testículo maduro en la zona ventral testicular de la gónada proliferada. Terminada la etapa de cría, se iniciará el reverso del sexo (17 meses), pudiéndose conseguir el proceso de reversión completado en un 80 % de la población a hembras (Navarro-Flores et al., 2019)

Por último, cabe destacar las técnicas de ajuste de fotoperiodo expuesto ya que ayuda a postponer el desarrollo gonadal y la reproducción en la cultura del comercio de dorada, permitiendo así un aumento equitativo del peso corporal, y permitiendo el almacenamiento del producto a un tamaño de mercado sin que se produzcan pérdidas (Kissil et al., 2001).

En líneas generales, los criaderos poseen cada uno sus lotes específicos de reproductores, provenientes o bien de granjas o de pesca salvaje. Estos lotes suelen estar formados por hembras de hasta cinco años o machos desde uno (Linnaeus, 1758).

Las puestas suelen realizarse desde noviembre hasta febrero-marzo, y en ocasiones especiales, hasta abril. Cabe destacar que en los criaderos se ha conseguido que, mediante un manejo específico del fotoperiodo establecido, las puestas puedan realizarse en todas las épocas del año, en la ilustración 8 podemos observar un esquema de un ciclo productivo en condiciones intensivas.

El factor fundamental para la puesta es la temperatura, ya que cuando esta no se desencadena de forma espontánea, una elevación de este parámetro puede que la ejerza.

En caso de suministro de hormonas (hormona gonadotropina coriónica humana (hCG) a una dosis de 200-250 UI por kilogramo de hembra, o análogos de la LHRH a una dosis de 1 µg por kilogramo de hembra), las puestas no se prolongan mucho tiempo. Una vez realizado el pinchazo, la puesta se produce 1-2 días después y es seguido de la disminución de la fecundidad de la hembra (ilustración 8).

Si establece una fecundidad de 800.000 huevos/kg de hembra, que se ha asignado ese parámetro como el óptimo, y considerando cualquier tipo de fallo en la puesta, una hembra de dorada produce unos 250-300.000 larvas (Ortega, 2008), con una ratio de fecundación del 90-95% (Sola et al., 2006).

Los huevos fecundados se recogen de los tanques mediante unos colectores superficiales que se sitúan a la salida de tanques (malla de 400-500 µ por el que se hace pasar el agua que sale del tanque). Para que se ejerza la incubación, los huevos recién eclosionados deben cumplir una serie de parámetros: diámetro de la esfera de 0,95 y 1 mm, y gota de grasa entre 0,2 y 0,23 mm de diámetro, buena flotabilidad y transparencia.

La incubación se realiza en tanques troncocónicos entre 100 y 500 litros en los que se mantendrá la renovación continua de agua. Esta agua debe ser filtrada y esterilizada, con una salinidad superior a 35 ‰. Este proceso tiene una duración de 40 – 45 °C día (2 días a 19-20 °C), y se produce una tasa de eclosión del 70 %.

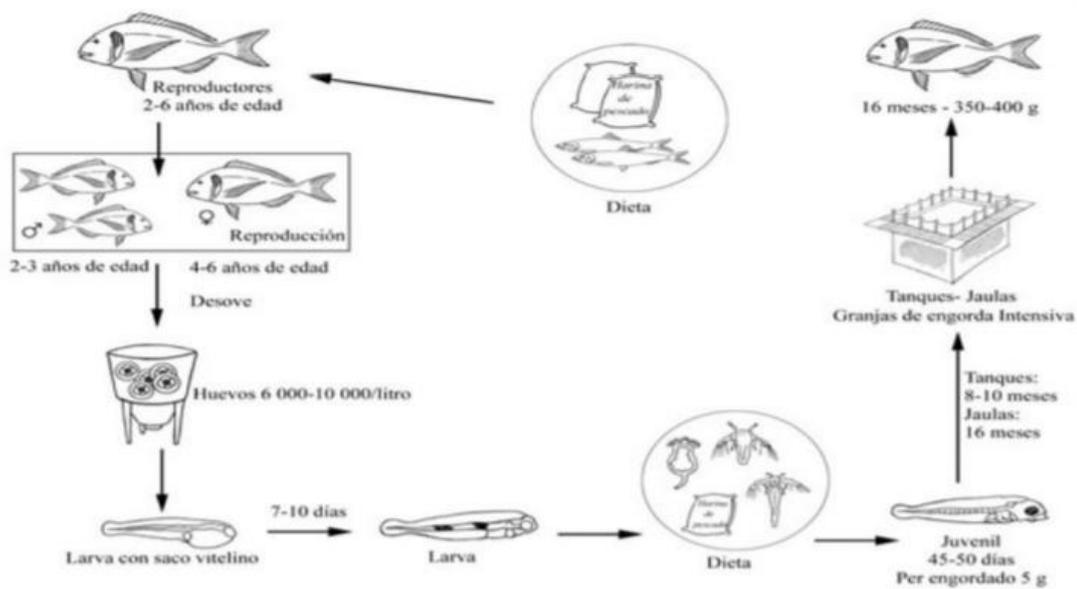


Ilustración 8. Ciclo productivo de Sparus aurata L. en condiciones intensivas (Linnaeus, 1758)

#### 1.2.4. Sistemas de cría

La crianza de dorada se inició en España en la Planta de Cultivos Marinos del Instituto Español de Oceanografía en Lo Pagán, a final de la década de los 70, con salinidades entre el 44 y el 53 ‰, cerrando así los ciclos de cultivo. Durante la década de los 80 se avanzó en el refinamiento de las técnicas de crianza, sin unos resultados adecuados de larvas y alevines suficientes para satisfacer la demanda de mercado. Cuando se alzó la década de los 90, los criaderos tornaron los niveles de producción de alevines suficiente como para hacerse su paso en el mercado y generar un beneficio significativo.

Actualmente, los cultivos intensivos y jaulas a mar abierto son los sistemas de cría más utilizados. En España se pueden distinguir diversos establecimientos acuícolas una vez que se mejoraron las técnicas y las tecnologías existentes como para producir de acuerdo con una acrecentada demanda (Ortega, 2008).

#### Fase larvaria

Al eclosionar los huevos, los individuos recién nacidos se denominan larvas. Hay dos tipos de crianza de larvas, de pequeña y gran escala. En los de pequeña escala, las dimensiones establecidas se encuentran en un valor inferior a 10 m<sup>3</sup>. Los de gran escala, en cambio, pueden adquirir hasta 200 m<sup>3</sup> de dimensión. El primer caso está más

enfocado en la cría de grandes cantidades de juveniles (150-250/litro), mientras que el otro se enfrenta a una producción considerablemente inferior (10/litro).

Los tanques de cultivo larvario consisten en unos artefactos de grandes volúmenes (5.000 y 20.000 litros para crianza intensiva y algo mayores, de 30.000-50.000 litros si se usan técnicas de mesocosmos). En España, el método empleado habitual es el intensivo, con densidades entre 50-100 larvas/litro. En cuanto a la luz, se usan intensidades moderadamente elevadas, de 500-1.000 luxes, y fotoperiodos largos, de 24 horas al inicio de la fase larvaria.

Con una temperatura óptima de 20-22 °C y los parámetros previamente designados se consigue una elevada supervivencia, generalmente superior al 20 % y, en algunos casos, consigue alcanzar el 30 -35 %.

### Nursery

Comienza a los 70-80 días, cuando sacamos a los alevines de la sala de cultivo larvario. Tienen entonces un peso medio de 0,1-0,2 gramos, y son todavía muy débiles para exponerlos a las condiciones del engorde. Son destinados a las instalaciones de engorde cuando han adquirido un peso de 1-2 g.

El agua es filtrada, o bien por arena, o bien por un filtro de tambor de 30-50  $\mu$ . Los tanques son redondeados o cuadrados, y relativamente pequeños para facilitar su manejo, con un volumen variable entre 5.000 y 15.000 litros.

### Preengorde

Se estima una duración variable de esta fase entre 45 y 120 días, teniendo en consideración la temperatura del agua. Por lo general, a temperaturas en un rango de 25-26 °C el crecimiento es aceleradamente rápido, permitiendo que las doradas alcancen los 20 gramos en dos meses.

Se consideran dos categorías de tanques: alargados *raceway* de plástico u hormigón, o bien tanques redondos de plástico o poliéster. Las dimensiones pueden ser o de 5-10 m de largo x 1-2 m de ancho, o para los redondos de 3-6 m de diámetro, y unas profundidades entre 10-40 m<sup>3</sup> de capacidad (ilustración 9).

Las densidades finales deben ser de 10-20 kg/m<sup>3</sup>, mediante unos caudales de agua elevados, con 1-2 renovaciones por hora mínimo, ya que las demandas de oxígeno en esta fase suelen ser bastante grandes (300-400 mg de O<sup>2</sup>/kg de pez y hora).



Ilustración 9. Tanques de preengorde.

### **Engorde**

El engorde de dorada en nuestro país es uno de los sistemas de piscifactoría más extendidos. Por lo general, en España es común el sistema de engorde en jaulas y un estancamiento de la producción en tierra (85 % del total de los sistemas productivos en España es en jaulas).

En esta fase, se estima que el periodo en alcanzar la talla comercial (350-400 g) oscila entre los 13-16 meses dependiendo de la época de inicio de engorde, exceptuando las zonas más frías en las que se puede extender hasta los 18 meses.

Aun considerando que el sistema más extendido en España es en tierra, se pueden considerar tres tipos distintos de técnicas empleadas para el engorde:

#### **- Engorde en playa, zona intermareal y esteros:**

Consiste en **estanques** excavados en tierra de zonas salinas o marítimas, y consiste en un tipo de acuicultura con un requerimiento mínimo de intervención por parte del hombre.

#### **- Engorde en tierra:**

Es realizado en **tanques** o **estanques**. El primer tipo mencionado es típico de acuicultura intensiva, mientras que el segundo es de extensiva o semiintensiva. Los

estanques suelen tener forma rectangular o cuadrada y se encuentran excavados en el suelo. Además, pueden ser o bien de hormigón, o mixtos (hormigón-tierra), y contar con una extensión de centenares o miles de m<sup>2</sup>, con profundidades que alcanzan los 1-1,5 m aproximadamente.

En cuanto a los tanques, estos son circulares, de hormigón, poliéster o incluso diversos materiales plásticos o metálicos debidamente protegidos.

### **- Engorde en jaulas:**

El engorde de dorada en jaulas es la opción mayoritariamente escogida en la actualidad para realizar el engorde de dorada, y desde hace varios años que no se construyen nuevas instalaciones en tierra de engorde de doradas.

Las jaulas utilizadas en España (ilustración 10), se basan en los modelos escandinavos para la salmonicultura: jaulas de polietileno de alta densidad, con una doble corona de flotación y una barandilla superior. Tienen un diámetro comprendido entre los 16 y los 25 metros, y una profundidad de 10-12 metros de red. Esto supone que cada jaula tiene un volumen de 2.000-6.000 m<sup>3</sup> de capacidad



Ilustración 10. Jaulas marinas de engorde.

### **1.3. Principales enfermedades en dorada**

En cuanto a enfermedades parasitarias, existe una elevada mortalidad tanto en peces en estado salvaje como en cautividad, aunque es cierto que se ha visto acrecentada la tasa de incidencia de bacteriosis en producciones intensificadas (Baptista, T., Costa, J. y Soares 1998). Cuando sucede la infección, pueden observarse ectoparásitos en piel y branquias, y endoparásitos en los órganos internos, tanto en cavidad abdominal como

en la musculatura. Existe una amplia gama de denominaciones de enfermedades generadas por parásitos, citando, por ejemplo:

### **Linfocistis**

La causa un iridovirus y consiste en la implantación de unos nódulos de color blanco o gris en la superficie del pez. Se observa con más asiduidad en verano, y no causa mortalidad. La inyección de inmunoestimulantes o la mejora de las condiciones de cultivo puede prevenir la aparición de dicha enfermedad.

### **Flexibacteriosis**

Causada por *Tenacibaculum maritimum*, antes *Flexibacter maritimus*. Ocasiona zonas necróticas en la piel y la aleta caudal, afectando también a las branquias.

### **Vibriosis**

Ocasionada por *Photobacterium damsela* subespecie *damsela* (antes *Vibrio damsela*). Vibriosis que afecta al tubo digestivo. El foco de infección es más representativo en verano, con elevadas temperaturas. Se observa una congestión y dilatación del tubo digestivo. Se trata igual que la pasteurelisis.

### **Epiteliocistis**

La ocasionan bacterias del tipo Clamydias. Suele ocurrir en invierno y no genera mortalidad, solo cuando las infecciones son severas pueden derivar en cierta mortalidad por dificultades respiratorias.

### **Enfermedad del punto blanco marino**

La causa *Cryptocaryon irritans*, siendo este un protozoo ciliado precursor de enfermedades en gran cantidad de especies marinas. El campo de actuación de dicho parásito se da por encima de 19 °C, desarrollándose de forma asincrónica las diferentes fases vitales. El resultado sintomático consta de peces letárgicos con dificultades respiratorias y sin apetito que generan opacidad en la córnea y puntos blancos en la piel. Por último, como método preventivo al desencadenamiento de la enfermedad serían tratamientos con vitamina C e inmunoestimulantes.

### **Pasteurelisis**

Una de las más destacables, y sobre la que se analizará con detalle más adelante. La causa *Photobacterium damsela* subespecie *piscicida*. Está considerada como enfermedad aguda, de elevada mortalidad o como una enfermedad crónica. Sólo se

muestran signos de infección a nivel interno en la zona del bazo, donde se denota una inflamación e incluso gránulos blanquecinos. En cuanto al tratamiento se deben suministrar antibióticos orales: quinolonas, sulfamidas potenciadas con trimetoprim, oxitetraciclina y florfenicol.

*Photobacterium damselae* subsp. *piscicida* (anteriormente *Pasteurella piscicida*) es el causante de la pasteurelosis, o pseudotuberculosis, siendo ésta una septicemia bacteriana causada por la bacteria halófila. Los síntomas que podemos observar son tumoraciones de entre 0,3-0,5 mm en algunos órganos, externamente se observa el estómago distendido e internamente una congestión y dilatación del tubo digestivo. El pico de proliferación de dicho patógeno se da en verano, con elevadas temperaturas. Aunque esta enfermedad se describió por primera vez en poblaciones silvestres de perca blanca y lubina rayada, actualmente los huéspedes naturales del patógeno son una gran variedad de peces marinos. La enfermedad tiene un gran impacto económico tanto en Japón, donde afecta principalmente a los cultivos de cola amarilla, como en el área mediterránea, debido a las pérdidas que causa en las granjas de doradas y lubinas. (Baptista *et al.*, 1998).

Este patógeno, el cual afecta numerosa variedad de especies marinas además de la dorada, presenta gran interés en el campo de la microbiología. Entre las especies a las que puede infectar se encuentra la lubina, (*Dicentrarchus labrax*), la dorada (*Sparus aurata*) y el lenguado (*Solea senegalensis* y *Solea solea*) en Europa (Thune *et al.*, 1993), el jurel (*Seriola quinqueradiata*) en Japón, la raya (*Morone saxatilis*), híbrido rayado bajo (*Morone saxatilis*) y perca blanca (*Morone americana*) en Estados Unidos, la cobia (*Rachycentron canadum*) en Taiwán, así como el pámpano dorado (*Trachinotus ovatus*) en China (Ho *et al.*, 2011; Romalde, 2002; Wang *et al.*, 2013).

La patogénesis de *Photobacterium damselae* es un proceso que no se llega a comprender en profundidad (López-Dóriga *et al.*, 2000), además de encontrarse poca información sobre la variación genética en cuanto a la resistencia a dicha bacteria, convirtiendo este en un campo innovador con amplia posibilidad de avance en acuicultura.

#### 1.4. PROGENSA III

Este estudio se encuentra enmarcado dentro del proyecto PROGENSA, el cuál es financiado por la Junta Nacional de Cultivos Marinos (JACUMAR) y en él participan el Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC), el Instituto Español de Oceanografía (IEO), el Instituto Andaluz de Investigación y Formación Agraria, Pesquera, Alimentaria y de la Producción Ecológica (IFAPA), y la Universidad Politécnica de Cartagena (UPCT). Su primera fase se inició en 2008 (PROGENSA I) y concluyendo con su última fase que inicio en 2016 con una duración de dos años (PROGENSA III) realizaron. Estos proyectos, surgen con el objetivo de mejorar la competitividad del sector de la dorada a través de la mejora genética, estableciendo un programa de mejora en esta especie que hasta entonces era inexistente.

En esta tercera fase, se ha seguido con el programa de mejora genética para la producción de una tercera generación de animales seleccionados por caracteres de crecimiento y ausencia de malformaciones, continuando con la optimización de la gestión y manejo de reproductores bajo puesta masal y con el banco de germoplasma. Además, se ha completado el estudio sobre el efecto de dietas altamente eficientes para distintos genotipos, la variabilidad genética para la resistencia a patógenos (*Photobacterium damsela* subespecie *piscicida*), el desarrollo de nuevas Tecnologías Facilitadoras Clave (KET's), y de nuevas jornadas de conocimiento.

Por lo que con lo anteriormente comentado y gracias programa PROGENSA III, se ha podido llevar a cabo la realización de los diferentes trabajos de campo para la realización de la infección con el patógeno *Photobacterium damsela* subespecie *piscicida*.

## 2. OBJETIVOS

El presente Trabajo Fin de Grado se enmarca dentro del proyecto PROGENSA III cuyo fin es la mejora de la competitividad del sector acuícola productor de dorada mediante un proceso de selección genética. En este trabajo, en particular, se pretende establecer una línea genética resistente al patógeno *Photobacterium damsela* (subespecie *piscicida*).

Para ello, este estudio tiene como objetivo prioritario analizar si existe una componente genética en la resistencia a la infección del patógeno *Photobacterium damsela* subespecie *piscicida*.

A partir de aquí, se establecen los siguientes objetivos específicos:

- a) Establecimiento de diferentes líneas genéticas con diferente origen de procedencia a partir de puestas masales de dos poblaciones de reproductores: AND-CAN y MUR. Caracterización fenotípica de las poblaciones.
- b) Caracterización genética de las poblaciones mediante marcadores microsatélites. Asignación de parentales.
- c) Estudio de la respuesta a la infección del patógeno *Photobacterium damsela* subespecie *piscicida* de las diferentes líneas genética.
- d) Estima del efecto genético (efecto paterno o materno) sobre la resistencia a *Photobacterium damsela* subespecie *piscicida*.
- e) Estudio técnico económico sobre la creación de una línea genética resistente.

## 3. MATERIAL Y MÉTODOS

### 3.1. Producción de una nueva generación a partir de puestas masales de una población de reproductores

Se partió de dos núcleos de reproductores:

- Núcleo F2 andaluz y canario (AND-CAN) de 51 reproductores que son la segunda generación de selección (F2) por crecimiento (ganancia media diaria) y ausencia de malformaciones, procedentes del IFAPA (Instituto de Investigación y Formación Agraria y Pesquera), y la ULGPC (Universidad de Las Palmas de Gran Canaria), mantenidos en las instalaciones del IFAPA.

- Núcleo F0 murciano (MUR) de 140 que nunca han sido sometidos a un proceso de selección y que se encuentran en las instalaciones del IEO (Instituto Español de Oceanografía del Puerto de Mazarrón).

El estudio de los diferentes caracteres se va a realizar sobre los descendientes de los progenitores. Por simplificar, llamaremos a los descendientes de cada núcleo con el nombre del núcleo, así los descendientes del núcleo AND\_CAN recibirán el mismo nombre.

Todos los progenitores fueron marcados mediante PIT-tags (*Passive Integrated Transponder*), los cuales permiten una trazabilidad absoluta de los lotes producidos. Estos, además, recibieron caracterización con la **Supermúltiplex de PCR de marcadores microsatélites SMsa1**.

Las puestas masales de los diferentes núcleos fueron sincronizadas y se llevaron a cabo en cuatro días consecutivos en dos momentos del periodo de puesta (al inicio de la puesta y tres semanas después de la toma anterior), distinguiéndose, a su vez, dos incubaciones.

A partir del 12.02.17 se seleccionaron las puestas de mejor calidad según los porcentajes de fecundación, simetría de las divisiones, gotas de grasa, y porcentajes de eclosión, y se trasladaron a tanques incubadores cilindro-cónicos de 1.000 litros de capacidad, provistos de circuito abierto de agua de mar y control de temperatura.

La fase larvaria fue realizada usando la metodología aplicada por Lee-Montero et al., 2013. A los 92 días tras la eclosión de todos los individuos, Murcia (IEO) recibió un lote de unos 3.000 peces AND-CAN y envió 6.200 peces MUR con el fin de estimar el efecto genotipo x ambiente.

Un lote de peces fue destinado al engorde en jaulas en el mar de la empresa Servicios Atuneros del Mediterráneo S.L. (Murcia). Este lote estaba formado por 1.000 alevines MUR y 1.100 alevines de AND-CAN, fueron marcados con PIT en la cavidad abdominal los días 13 y 14 de septiembre de 2017. Estos peces quedaron en tanques separados y fueron muestreados individualmente los días 9 y 10 de octubre, mediante equipo *FishReader* de TROVAN que mide peso y talla y lo asocia a la lectura del microchip (Ilustraciones 11 y 12). Posteriormente, se toma una muestra de aleta caudal que se

conserva en un eppendorf en etanol para proceder posteriormente a la extracción de ADN. Estos peces no fueron analizados en el presente trabajo.



Ilustración 11. Lectura del código de barras el eppendorf



Ilustración 12. Muestreo de peso

Estos peces fueron trasladados en noviembre a jaulas en el mar y fueron sometidos a condiciones intensivas de crianza: jaulas de 11 metros de diámetro anclada a 38 metros de profundidad (temperatura promedio del agua  $18,2 \pm 0,9^{\circ}\text{C}$ , oxígeno disuelto: 7,4 mg/l, salinidad: 37,9‰; datos estimados en condiciones de mar abierto) y alimentados con un pienso comercial (39% de proteína, 21% grasa, 2% de fibra; Dibaq S.A., Fuentespelayo-Segovia).

Otro lote de peces fue reservado para las infecciones experimentales con *Photobacterium* (Phb). En octubre de 2017, se procedió a coger unos 530 alevines del grupo AND-CAN y 460 de MUR, estos peces fueron marcados mediante PIT-tags y muestreados mediante equipo *FishReader*, y se realizó la extracción de sangre de cada

uno de los individuos después de la infección para determinar inmunoglobulinas y peroxidasa.

La peroxidasa se mide mediante unidades de absorbancia, teniendo en cuenta que la enzima en presencia de peróxido forma anión superóxido, si ponemos una molécula cromogénica en la reacción obtendremos la oxidación de la misma por el anión superóxido y por tanto un color que se mide por absorbancia. Expresándose los datos en unidad de peroxidasa/ml de suero o plasma. A más color en la reacción más peroxidasa. Hemos de saber que, en nuestro caso, se estudia ya que es un proceso celular llamado explosión respiratoria y que sirve para eliminar patógenos tras haberlos fagocitado por los macrófagos y los neutrófilos. Por lo que, cuanto mayor es el valor de peroxidasa, mayor absorbancia de la muestra y más eficaz será contra la destrucción del patógeno (Díaz-Rosales *et al.*, 2006)

La inmunoglobulina se mide usando un ELISA de captura y las unidades se dan en unidades de absorbancia, a más absorbancia más IgM presente en la muestra, Los datos se dan en valores de absorbancia a 450 nm (OD450nm) donde OD significa optical density, en este caso la IgM nos sirve para valorar el nivel de anticuerpos que actúa a la hora de defenderse tras la infección experimental del patógeno. Por lo que cuanto mayor es el valor de absorbancia, se considera un aumento en el número de anticuerpos que actúa en defensa del individuo (Cuesta *et al.*, 2004)

Una muestra representativa de alevines de diferente origen queda reservada en las instalaciones del centro como medida de seguridad para salvaguardar los objetivos del proyecto PROGENSA-III.

### **3.2. Respuesta a la infección del patógeno *Photobacterium damsela* y subespecie piscicida.**

Se realizó la infección con *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* (*Phb*) en las instalaciones del IEO, acondicionando una sala totalmente aislada del resto de instalaciones de la Planta de Cultivos. Esta consta de 50 m<sup>2</sup> con sistema de desagüe central y suelo provisto de una pendiente de 3 %, acabado en pintura epoxi antideslizante. Se procedió posteriormente a la instalación de aire acondicionado, con la intención de tener el control sobre parámetros de temperatura ambiente y de agua, así como luces con programación para controlar el fotoperiodo, entrada de agua de mar

y de agua dulce para los tanques. Se instalaron un total de cinco tanques con una capacidad de 200 litros, acondicionados con sistema de recirculación independiente, dos aireadores, tanque de estabilización y bomba de recirculación sumergible. Cada tanque con su sistema de registro de temperatura y salinidad para garantizar la estabilidad de las condiciones a lo largo del tiempo de experimentación.

En cuanto a los parámetros técnicos de la infección, se realizaron cultivos de la bacteria en caldo de triptona de soja (TBS), para su posterior lavado en tampón fosfato salino estéril mediante centrifugación a 2.700 rpm durante 15 minutos a 4 °C. La suspensión resultante fue ajustada a las concentraciones requeridas.

La infección transcurrió durante nueve días consecutivos, para ello se les administró una dosis de  $8 \times 10^4$  bacterias/pez en forma de inyección intraperitoneal con el patógeno a cada uno de los individuos, teniendo en cuenta que los juveniles de dorada infectados se dividieron en cuatro tanques distintos para un mejor manejo de los mismos. Una vez realizada la infección, los individuos fallecidos fueron recogiendo diariamente durante la duración de proceso hasta el octavo día, en el que solo hubo un fallecido, por lo que al noveno día se dió por concluido el experimento y se procedió al sacrificio del resto de peces resistentes a la infección. Como el rango de supervivencia es una variable dicotómica; se optó por tomar la siguiente nomenclatura: 0=supervivientes, 1 = no resistentes.

Al inicio, se probaron tres dosis de inoculación ( $0$ ,  $4,33 \times 10^7$ ;  $4,33 \times 10^6$ ;  $4,33 \times 10^5$  y  $4,33 \times 10^4$  bacterias/pez), administradas intraperitonealmente en 100  $\mu$ l de PBS estéril. Se inocularon en un número pequeño de ejemplares con el fin de estudiar la cantidad adecuada del patógeno para obtener un porcentaje medio de supervivencia en la población. Las doradas sujeto del experimento de las dosis bacterianas provenían del stock de reproductores del IEO, y fueron sometidas a un cribado con el fin de tener una población homogénea de 150 peces con peso medio de  $3,5 \pm 1,0$  g para cada prueba. Esta primera prueba tuvo un éxito de supervivencia alrededor del 57 % en la dosis mínima, mientras que en las otras el éxito de mortalidad fue pleno. En una segunda infección se inyectaron  $0$ ,  $4,15 \times 10^4$ ,  $4,15 \times 10^3$ ,  $4,15 \times 10^2$  y  $4,15 \times 10^1$  bacterias/pez administradas intraperitonealmente en 100  $\mu$ l de PBS estéril, obteniéndose un 90% de supervivencia únicamente en la dosis mayor. La tercera y definitiva prueba se efectuó con la intención de determinar el protocolo de crecimiento de bacterias previo a su inyección en el pez. De esta forma, se estableció una dosis adecuada para conseguir

un cierto porcentaje de supervivencia de  $8 \times 10^4$  bacterias/pez procedente de un cultivo líquido inoculado directamente con el aislado congelado y sin plaquear.

Una vez establecida la dosis de infección se inocularon los dos orígenes, AND-CAN (530 peces) y MUR (460 peces) con un peso medio de  $4,08 \pm 0,72$  g.



Ilustración 13. Infección de alevines de dorada.

Tras la infección se contabilizaron los peces que murieron de cada origen y los días de supervivencia, desde 1 hasta 9, a partir de 9 el pez se consideró que era resistente. Finalmente, todos los peces fueron sacrificados y congelados a  $-20^{\circ}\text{C}$  para la posterior extracción de ADN a partir de la aleta caudal.

### **3.3. PCR multiplex de marcadores microsatélites. Asignación de parentescos**

Se realizó el genotipado de todos los parentales y de los descendientes que fueron sometidos a la infección para los 11 microsatélites de la multiplex SMSa1 (Tabla 2).

Inicialmente, se llevó a cabo la extracción de ADN mediante el kit comercial EZNA Forensic (OMEGA), a partir de la aleta caudal. El ADN fue cuantificado mediante el espectrofotómetro *NanoDrop 2000 v.3.7* (Thermo Fisher Scientific Wilmington, U.S.A.). Una vez conocida la concentración, se procedió a la dilución de las extracciones de ADN en agua destilada para alcanzar una concentración homogénea de todas ellas de 10 ng/ $\mu\text{l}$ .

Posteriormente, se realizó una PCR con condiciones y concentraciones específicas (Tabla 1) y para la multiplex de marcadores microsatélites (Tabla 2).

Tabla 1 Los componentes y las concentraciones relativas de la PCR utilizada en Lee-Montero *et al.*, (2013).

<b>Componentes</b>	<b>Stock concentración</b>	<b>Concentración final</b>	<b>µl por muestra</b>
<b>Type-it microsátélites PCR kit. QIAGEN</b>	2x	1x	6,25
<b>Primers</b>	Mix de primers	0,02-0,08 µM	2
<b>Muestra ADN</b>	± 10 ng/µl	± 10 ng/12'5 µl	2
<b>H2O</b>	-	-	2,25
<b>Total</b>	-	-	12,5

Las reacciones fueron llevadas a cabo en el termociclador mediante los siguientes ciclos:

- 1. Desnaturalización inicial:** Incremento de temperatura a 95°C durante 5 minutos, que es el tiempo requerido para la desnaturalización del ADN; es decir, se separen las dos cadenas que lo forman.
- 2. Desnaturalización en cada ciclo:** mantenimiento de temperatura a 95°C durante 30 segundos.
- 3. Unión del cebador:** Se produce la unión por parte del cebador a su secuencia complementaria en el ADN molde al bajar la temperatura a 60°C durante 1 minuto y 30 segundos. En este caso, es la polimerasa la encargada de realizar la unión del híbrido de la cadena molde con el cebador y de comenzar la síntesis de ADN.
- 4. Elongación de la cadena:** El requisito para que se produzca este proceso es la elevación de la temperatura a 72 °C. seguidamente, la polimerasa sintetiza la nueva hebra de ADN complementaria a la hebra molde, partiendo del cebador como inicio de síntesis. La polimerasa va añadiendo dNTPs complementarios en dirección 5'→ 3'. Las etapas 2,3 y 4 son repetidas 28 veces.
- 5. Elongación final:** Prolongación durante 5 minutos una temperatura de 60°C. Nuestro objetivo aquí es ampliar cualquier cadena simple de ADN restante, en el último ciclo de PCR.
- 6. Conservación:** Disminuye la temperatura hasta 4°C durante 59 minutos, con la intención de que la reacción permanezca en condiciones óptimas.

Tabla 2. Microsatélites de la SuperMultiplex en dorada (SMsa1): código interno, nombres de locus, grupo de ligamiento (LG), número de acceso en GenBank (GENBANK), fluorocromo, motivo de nucleótido y concentración de cebador para cada marcador de microsatélite

Código	MICRO	LG	GENBANK	COLOR	MOTIVO	Rango alélico		
						Concentración $\mu\text{M}$	Inferior	Superior
1E	Bd-68-T	23	DQ851270	5' 6-FAM	(GT)10	0,06	77	85
3C	Eld-39-T	6	DQ851367	5' 6-FAM	(TG)27	0,06	106	140
4D	P3	1	DQ851284	5' 6-FAM	(TG)25	0,11	183	205
4E	Bld-18-F	11	DQ851280	5' NED	(AC)13*	0,06	63	90
5A	Bt-14-F	20	DQ851293	5' NED	(CA)15	0,03	104	110
5M	Ct27	24	DQ851320	5' NED	(TAGA)15	0,08	134	204
11L	Dld-16-F	10	DQ851339	5' PET	(GT)14	0,07	101	111
6F	Hd-25-F	3	DQ851392	5* PET	(GT)15*	0,09	124	142
11D	Cld-29-T	5	DQ851308	5' VIC	(GT)16	0,09	73	90
12C	Dt47	18	DQ851347	5' VIC	(CT)19*	0,03	119	133
9I	At37	19	DQ851250	5' VIC	(TAGA)13	0,04	153	169

Finalizadas las etapas anteriores, se congelan las placas en un frigorífico a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Estas fueron enviadas al Servicio Universitario de Instrumentación Científica de la Universidad de Murcia (SACE-SAIT), y así proceder a la lectura de los fragmentos.

El protocolo seguido para cargar las placas y que puedan ser leídas por el secuenciador fue el siguiente:  $1\text{ }\mu\text{l}$  de cada producto de reacción (diluido al 75% con agua Milli-Q) se mezcló con  $9,75\text{ }\mu\text{l}$  de Hi-Di formamida y  $0,25\text{ }\mu\text{l}$  de marcador de peso molecular GeneScan LIZ 500 (Applied Biosystems) y se cargó en un ABI Prism® 3130XL Secuenciador automático (Applied Biosystems) de 16 capilares con polímero POP-7 y condiciones de funcionamiento de  $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ ,  $3000\text{ v}$ ,  $1500\text{ s}$ .

Para realizar el genotipado de las muestras, fue preciso utilizar la aplicación de *Thermo Fisher Scientific (Cloud)*. Los archivos electrónicos correspondientes (formato fsa.), de cada una de las muestras fueron introducidos en dicha aplicación, donde se realizó el *Microsatellite Analysis* (análisis de microsatélites).

Seguidamente y una vez realizado el genotipado de las muestras, mediante el programa informático *VITASSING* (v.8-5.1) se realizó la asignación de parentescos de las poblaciones de descendencia recibidas, de tal forma que se obtuvieron las parejas de progenitores idóneas para cada individuo descendiente. Este programa consiste en un complemento de *Microsoft Excel* (2016), en la que se introducen datos genotípicos tanto de los padres (*sires*), madres (*dams*) e hijos (*offspring*) para cada uno de los 11 marcadores microsatélites, mediante un proceso de exclusión por incompatibilidad de genotipos va seleccionando los posibles padres y madres de cada individuo.

### 3.4. Análisis de frecuencia poblacional, mediante GenAlex.

Esta nueva etapa del estudio se llevó a cabo mediante otro complemento de *Microsoft Excel* (2016), conocida como *GenAEx* (v.6.5). Primeramente, el programa requiere que se establezca una tabla genotípica de los individuos para sus respectivos once marcadores microsatélites, obteniendo, por consiguiente, dos archivos diferentes; uno con la tabla genotípica de los progenitores (229 individuos) y otra con la descendencia (691 individuos).

Se calculó la frecuencia de cada alelo para cada uno de los 11 locus. Esto permite conocer el número efectivo de diferentes alelos (**Ne**) que plantea cada uno de los locus en la población, mediante la aplicación de la fórmula expuesta en la tabla 5.

Seguidamente, se calculó el Índice de Shannon (**I**), parámetro utilizado para cuantificar la biodiversidad específica, el cual presenta valores más elevados para aquellos locus que adquirieron una frecuencia alélica superior (Tabla 3).

Sin embargo, el parámetro más determinante de este apartado es la heterocigosidad esperada y observada. La heterocigosidad esperada (**He**) consiste a la heterocigosidad existente en cada locus si el apareamiento de los individuos se efectuase de forma aleatoria, mientras que la observada (**Ho**) es la generada en cada locus de la población de estudio. En ambas se establece un rango entre 0 y 1, valorando de esta forma la variación genética de la muestra.

Por otro lado, la heterocigosidad esperada imparcial (**uHe**) no tiene en cuenta si los individuos de la población son o no familiares, solamente el tamaño de esta. Se debe conocer con anterioridad la heterocigosidad esperada de la población.

El último parámetro por definir fue el índice de Fijación (**F**), el cual permite definir la reducción de heterocigosidad de los individuos debido a los cruzamientos no azarosos con respecto a la población total.

Tabla 3. Expresión de los parámetros relacionados con la heterocigosidad en el programa GenAlex (v.6.5)

<b>Parámetro</b>	<b>Fórmula</b>
<b>Ne (frecuencia alélica)</b>	$Ne = 1/\text{Sum } p_i^2$
<b>I (índice de Shannon)</b>	$I = -1 \times \text{Sum } (p_i \times \ln(p_i))$
<b>He (heterocigosidad esperada)</b>	$He = 1 - \text{Sum } p_i^2$
<b>Ho (heterocigosidad esperada)</b>	$Ho = N.Hets / N$
<b><math>\mu</math>He (heterocigosidad esperada imparcial)</b>	$uHe = (2N / (2N - 1)) \times He$
<b>F (Índice de fijación)</b>	$F = (He - Ho) / He$

Pi: frecuencia de cada alelo; N: número total de muestras (691 para descendientes, 229 para progenitores); N.Hets: número de individuos heterocigotos para ese determinado locus.

### 3.5. Análisis estadístico

Las variables cuantitativas como el peso, la talla, concentración de IgM y de peroxidasa se analizaron mediante un Modelo Lineal General Univariante que incluía el efecto fijo el origen de los peces (MUR y AND-CAN). En el caso de las concentraciones IgM y peroxidasa se incluyó también como covariable el peso del pez en el momento de la infección. Se ha supuesto un efecto significativo para  $P < 0,05$ .

Para las variables categóricas, supervivencia (1=susceptible, 0=resistente), se han realizado histogramas de frecuencia por origen y pruebas no paramétricas por origen para saber si las diferencias eran significativas. Para la variable categórica días de supervivencia post-infección (desde 1 hasta 9) se han realizado histogramas de frecuencia. Igualmente se han calculado frecuencias de supervivencia de los descendientes por padre y madre dentro de origen. Para determinar si existe un efecto

de progenitor sobre la supervivencia se ha hecho un test chi cuadrado considerando solo aquellos progenitores que tenían 5 o más descendientes.

El programa informático utilizado fue el paquete estadístico SPSS (v.24.0), (SPSS, Chicago, IL, USA).

## 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 4.1. Establecimiento de líneas genéticas

A partir de las puestas masales de los dos núcleos de reproductores AND-CAN y MUR, se partía de 990 individuos (530 y 460, respectivamente) que después de diversas pruebas previas a la infección para ajustar la dosis optima de supervivencia al patógeno, se contó con un total de 690 juveniles de dorada 324 juveniles AND-CAN y 366 MUR.

Respecto a los valores de peso de los reproductores por origen (tabla 4), se puede observar que los reproductores MUR fueron de menor peso que los AND-CAN (aproximadamente 300 gramos menos); y esta diferencia se transmite a su descendencia, siendo los alevines MUR 2,2 gramos más pequeños que los AND-CAN, lo que supone un 14% más respecto al valor promedio.

Comparando el peso de nuestros descendientes con los de García-Celdrán *et al.* (2015) con alevines que se utilizaron en PROGENSA I, los alevines origen AND-CAN a la edad de 163 dpe pesaron 11,7 gramos y a los 368 dpe 38,9 gramos, valores entre los que se encuentran las poblaciones de descendientes AND-CAN actuales. En el PROGENSA I no se utilizaron alevines MUR.

Tabla 4. Peso promedio del lote de reproductores y descendientes a los 247 días post-eclosión

	<b>Progenitores (g)</b>	<b>Descendientes (g)</b>
<b>MUR</b>	1642 <sup>a</sup> ± 56	14,9 <sup>a</sup> ± 0,27
<b>AND-CAN</b>	1919 <sup>b</sup> ± 43	17,1 <sup>b</sup> ± 0,49

n reproductores: AND-CAN = 51; MUR = 135; n descendientes: AND-CAN = 224; MUR 366.

a,b , letras diferentes en los superíndices denotan diferencias significativas (P<0,05)

Cuando analizamos el peso y talla de los progenitores por origen y sexo (tablas 5 y 6) se observa que los machos MUR eran menos pesados (aproximadamente 600 gramos menos) que las hembras MUR y que los machos y las hembras AND-CAN. Respecto a

la talla, los machos MUR midieron 6 cm menos que las hembras MUR pero no fueron distintos a los progenitores AND-CAN, esto puede ser debido a la forma de medir la longitud total de los peces en ambos orígenes, o al final de la cola o hasta la horquilla.

Tabla 5. Peso promedio de los progenitores por origen y sexo

	<b>MUR (g)</b>	<b>AND-CAN (g)</b>
	m ± s.e.	m ± s.e.
<b>Machos</b>	1317 <sup>a</sup> ± 45	1911 <sup>a</sup> ± 105
<b>Hembras</b>	1929 <sup>b</sup> ± 70	1958 <sup>a</sup> ± 50

m= media, s.e. error estándar. a,b , letras diferentes en los superíndices dentro de la misma columna denotan diferencias significativas (P<0,05)  
n AND-CAN machos = 17; n AND-CAN hembras = 34; n MUR machos= 58; n MUR hembras = 77

Tabla 6. Talla promedio de los progenitores por origen y sexo

	<b>MUR (cm)</b>	<b>AND-CAN (cm)</b>
	m ± s.e.	m ± s.e.
<b>Machos</b>	43,5 <sup>a</sup> ± 0,47	43,1 <sup>a</sup> ± 0,82
<b>Hembras</b>	49,3 <sup>b</sup> ± 0,57	43,5 <sup>a</sup> ± 0,40

m= media, s.e. error estándar. a,b , letras diferentes en los superíndices denotan diferencias significativas (P<0,05)  
n AND-CAN machos = 17; n AND-CAN hembras = 34; n MUR machos= 58; n MUR hembras = 77.

#### 4.2. Caracterización genética de la población a través de marcadores microsatélites. Asignación de parentescos.

En el genotipado de los individuos para los microsatélites de la SMSa1 se obtuvieron los electroferogramas (ilustración 18) donde se procedió a la lectura de la longitud de los fragmentos con la aplicación Thermo Fisher Scientific, y el genotipado para los alelos de cada individuo. En la ilustración 18 se ejemplifica gráficamente un ejemplo de electroferograma para la muestra del descendiente 225.

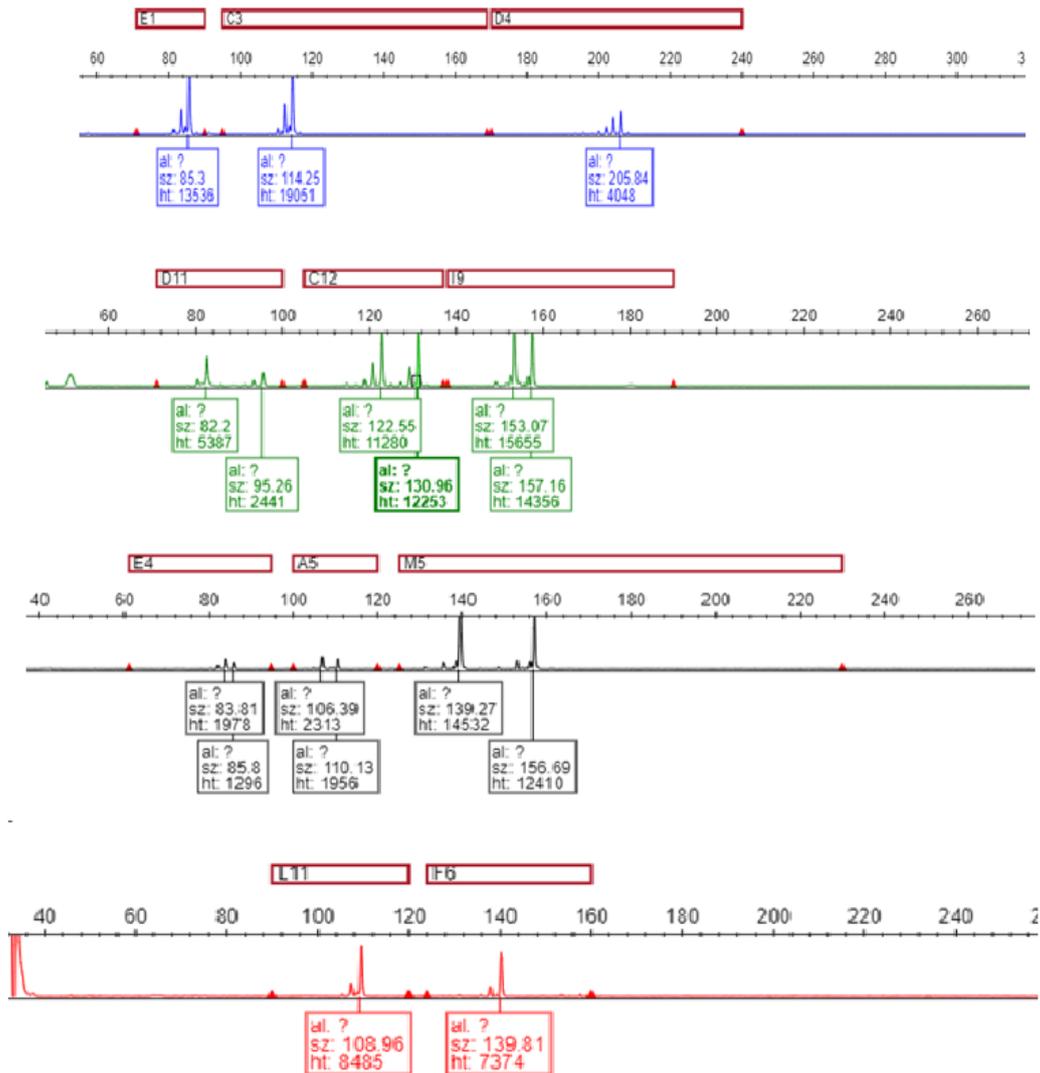


Ilustración 8. Ejemplo de electroferograma para todos los microsatélites.

El mismo programa informático (Thermo Fisher Scientific) fue utilizado para generar una tabla Excel con los genotipos de todos los individuos, y así obtener los alelos respectivos diferenciados por microsatélites. Los marcadores microsatélites se redondearon a un número par, a excepción de L11, 4D y C12 que se redondean a una cifra impar, criterio que se eligió a la hora de desarrollar el panel de microsatélites SMsa1. En el siguiente paso, se revisó y ajustaron los rangos alélicos de cada microsatélite por si había datos anómalos que no se encontraran dentro de los rangos descritos en la tabla 2.

A partir de los genotipos, se realizó un estudio de frecuencia genética de los diferentes marcadores microsatélites para las poblaciones tanto de progenitores, como de sus respectivos descendientes procedentes del grupo MUR e AND-CAN.

Los microsatélites más polimórficos e informativos fueron, para la población de reproductores de MUR el 5M y el C3, mientras que los que menos fueron 11L, 5A y 6F

(tabla 11). Para AND-CAN, siguen siendo el 5M y el C3 los más polimórficos, aunque este último presenta menos alelos (25). Ocurre lo mismo para la descendencia, sin embargo, el número de alelos para esta ha descendido considerablemente (15 y 16) (tabla 12). Los menos informativos, tanto para progenitores como para descendientes resultaron ser 11L, 5A y 6F.

En cuanto al balance de pérdidas y ganancias alélicas, en los descendientes de la población MUR (tabla 12), se produjo una ganancia de alelos en la mayoría de los microsatélites excepto 11D, 5M, C3 y E1. Por otro lado, para la población AND-CAN (tabla 13) existe aún menos pérdida, localizándose en los microsatélites 6F y E1. En el TFM de Vallecillos-Quijada (2018) en el que se trabajó con poblaciones de dorada criadas en las instalaciones del IEO, tal y como tenemos para nuestra población MUR, se observó una cantidad de pérdida de alelos parecida a la de la población de este estudio.

Si ponemos en perspectiva otros estudios realizados con la misma Supeprmultiplex (SMSa1) en poblaciones de dorada ( Lee-Montero *et al.*, 2013), se observa que en este caso los microsatélites más polimórficos fueron A5 y E1, y los que menos resultaron ser 5M y 11L, siendo el 5M el que más informativo resultó para nuestras poblaciones. Es una diferencia bastante considerable, teniendo en cuenta que se trata de un estudio realizado para poblaciones de dorada del marco PROGENSA I, lo cual indica que las descendencias siguientes han modificado las estructuras alélicas.

Si se hace un análisis en cuanto a la heterocigosidad esperada de las poblaciones de descendiente y reproductor para MUR y AND-CAN, se aprecia que la heterocigosidad esperada se reduce ligeramente en los dos casos desde progenitores a los descendientes. Para MUR (tablas 7 y 8), la heterocigosidad se reduce desde un 0,75 hasta un 0,73 respectivamente, y de 0,78 a 0,74 en AND-CAN (tablas 9 y 10). La mayor diferencia se observa en AND-CAN. Sin embargo, en el caso del núcleo MUR, la heterocigosidad observada es mayor en la población de descendientes que en la de los progenitores a diferencia de la heterocigosidad esperada. Esto puede explicarse debido a que, o bien se favorecen cruzamientos entre homocigotos y, por tanto, se produce un incremento de heterocigotos, o que estén generándose mutaciones

. Tabla 7. Información genética de la SuperMultiplex (SMsa1) en los reproductores del núcleo MUR

Microsatélites	Nomenclatura	Tamaño de los alelos (pb)	Nº Alelos	Ho	He
GenBank	Interna				
DQ851308	11D	72-100	12	0,847	0,806
DQ851339	11L	97-113	5	0,547	0,515
DQ851280	4E	62-92	9	0,839	0,826
DQ851293	5A	100-112	5	0,635	0,580
DQ851320	5M	126-226	28	0,825	0,863
DQ851392	6F	124-158	5	0,401	0,623
DQ851250	9I	130-190	14	0,737	0,824
DQ851347	C12	111-137	6	0,737	0,706
DQ851367	C3	104-166	28	0,891	0,922
DQ851284	D4	181-207	11	0,567	0,825
DQ851270	E1	72-88	9	0,942	0,814
<b>Global</b>				<b>0,72</b>	<b>0,75</b>

Ho: heterocigosidad observada; He: heterocigosidad esperada.

Tabla 8. Información genética de la SuperMultiplex (SMsa1) en los descendientes de MUR

Microsatélites	Nomenclatura	Tamaño de los alelos (pb)	Nº Alelos	Ho	He
GenBank	interna				
DQ851308	11D	72-100	10	0,815	0,733
DQ851339	11L	97-113	10	0,481	0,478
DQ851280	4E	62-92	15	0,901	0,848
DQ851293	5A	100-112	9	0,62	0,639
DQ851320	5M	126-226	22	0,88	0,827
DQ851392	6F	124-158	9	0,544	0,575
DQ851250	9I	130-190	16	0,849	0,853
DQ851347	C12	111-137	12	0,687	0,682
DQ851367	C3	104-166	21	0,929	0,888
DQ851284	D4	181-207	13	0,732	0,829
DQ851270	E1	72-88	8	0,791	0,712
<b>Global</b>				<b>0,75</b>	<b>0,73</b>

Tabla 9. Información genética de la SuperMultiplex (SMsa1) en los reproductores del núcleo AND-CAN

Microsatélites GenBank	Nomenclatura Interna	Tamaño de los alelos (pb)	Nº Alelos	Ho	He
DQ851308	11D	72-100	14	0,957	0,852
DQ851339	11L	97-113	6	0,872	0,745
DQ851280	4E	62-92	9	0,809	0,806
DQ851293	5A	100-112	4	0,617	0,626
DQ851320	5M	126-226	28	0,894	0,861
DQ851392	6F	124-158	5	0,915	0,754
DQ851250	9I	130-190	13	0,891	0,813
DQ851347	C12	111-137	7	0,660	0,666
DQ851367	C3	104-166	25	0,870	0,863
DQ851284	D4	181-207	10	0,791	0,750
DQ851270	E1	72-88	9	0,870	0,832
<b>Global</b>				0,83	0,78

Tabla 10. Información genética de la SuperMultiplex (SMsa1) en los descendientes de AND-CAN

Microsatélites GenBank	Nomenclatura interna	Tamaño de los alelos (pb)	Nº Alelos	Ho	He
DQ851308	11D	72-100	11	0,907	0,859
DQ851339	11L	97-113	5	0,709	0,617
DQ851280	4E	62-92	8	0,921	0,836
DQ851293	5A	100-112	4	0,656	0,623
DQ851320	5M	126-226	15	0,868	0,872
DQ851392	6F	124-158	3	0,533	0,496
DQ851250	9I	130-190	9	0,846	0,850
DQ851347	C12	111-137	7	0,656	0,644
DQ851367	C3	104-166	16	0,903	0,847
DQ851284	D4	181-207	9	0,709	0,654
DQ851270	E1	72-88	7	0,952	0,844
<b>Global</b>				0,79	0,74

Tabla 11. Variación del número de alelos por microsatélite para MUR de los progenitores y los descendientes

<b>Microsatélites</b>	<b>Progenitores (nº alelos)</b>	<b>Descendientes (nº alelos)</b>	<b>Variación en número de alelos</b>
<b>11D</b>	12	10	-2
<b>11L</b>	5	10	5
<b>4E</b>	9	15	6
<b>5A</b>	5	9	4
<b>5M</b>	28	22	-6
<b>6F</b>	5	9	4
<b>9I</b>	14	16	2
<b>C12</b>	6	12	6
<b>C3</b>	28	21	-7
<b>D4</b>	11	13	2
<b>E1</b>	9	8	-1

Tabla 12. Variación del número de alelos por microsatélite para AND-CAN de los progenitores y los descendientes

<b>Microsatélites</b>	<b>Progenitores (nº alelos)</b>	<b>Descendientes (nº alelos)</b>	<b>Variación en número de alelos</b>
<b>11D</b>	14	11	3
<b>11L</b>	6	5	1
<b>4E</b>	9	14	1
<b>5A</b>	4	7	1
<b>5M</b>	28	22	9
<b>6F</b>	5	6	-1
<b>9I</b>	13	15	1
<b>C12</b>	7	9	1
<b>C3</b>	25	17	3
<b>D4</b>	10	13	2
<b>E1</b>	9	8	-2

Una vez finalizados todos los genotipados, y habiendo exportado los genotipos al programa VITASSING (v.8-5.1) se procedió a la asignación de las muestras, obteniendo 270 familias de las dos procedencias mediante la modificación de los genotipos para hallar aquellos de máxima similitud con sus progenitores. En la tabla 13 se muestra el

genotipo del individuo 225 y de sus dos progenitores asignados (macho 68, y hembra 28).

Tabla 13. Ejemplo de genotipo para una familia.

	11D	11L	4E	5A	5M	6F	9I	C12	C3	D4	E1
<b>225</b>	82 96	109 109	84 86	106 110	140 156	140 140	158 162	123 131	114 114	201 205	86 86
<b>68</b>	90 96	109 109	84 88	106 108	136 156	140 140	158 158	123 125	114 134	201 207	80 86
<b>28</b>	82 86	107 109	84 86	108 110	136 140	140 140	154 162	131 133	114 148	199 199	84 86

Antes de iniciar la asignación, se estandarizó un número máximo de seis *mismatches* entre descendiente y progenitor, siendo esto la cantidad de disparidades en los alelos entre uno y otro para cada microsatélite. Para esta muestra, sólo queda un único *mismatch* remanente después de haber ajustado los datos del descendiente 225 en el microsatélite D4, ya que el alelo 205 no se ha podido ajustar para que exista coincidencia con los de los progenitores.

Para la población MUR con sus respectivos 135 progenitores (*sires y dams*), se obtuvieron 248 asignaciones de parentales, por lo que obtuvimos un 67% de asignaciones de individuos con una sola posible pareja de progenitores, mientras que para AND-CAN se han obtenido 122, procedentes de 51 progenitores (*sires y dams*), lo que nos da un 37,6 % de asignación para una sola posible pareja de padres.

En lo que respecta a las contribuciones familiares, se han analizado las familias que más descendencia han generado. Por un lado, las familias AND\_CAN más prolíficas han resultado ser, en cuanto a los machos, el E41 en primer lugar, ya que se le ha detectado en las familias de mayor descendencia (más de cinco hijos), junto con hembras como la E18 y la E24. En menor proporción, el macho E48 se le identifica en varias familias (más de cuatro hijos) junto con las hembras E24, E11 y E57, así como al macho E17 junto con la E11 y la E57 también.

En cuanto a los individuos MUR, primer lugar en cuanto a cantidad de descendencia lo ocupan el macho 94 y la hembra 24 (más de ocho hijos). En menores proporciones se destaca al macho 117 y la hembra 17, o al macho 29 y la hembra 67 (más de 4 hijos), pero con una diferencia significativa respecto a la familia 94-24.

En los anexos 1 y 2 se exponen las tablas de todas las familias obtenidas en este proceso.

#### 4.3. Respuesta a la infección del patógeno *Photobacterium damsela* subespecie *piscicida*.

Del total de los 691 individuos infectados fallecieron 457.0. Analizando el estudio de supervivencia por días de infección, es apreciable la concentración de mortalidades en torno al segundo día (136 individuos) para ambos orígenes, seguido de una notoria diferencia por el día uno (55 individuos). Los últimos días apenas se considera índice de mortalidades respecto a los primeros días (ilustración 15).

Por otro lado, se mostraron diferencias en la supervivencia de estos lotes de descendientes según el origen de procedencia de los individuos. Tal y como se aprecia en la ilustración 16, el nivel de especímenes procedentes del lote MUR presenta una tasa de mortalidad más alta, en torno a un 38%, mientras que para aquellos procedentes del lote sometido a previa selección genética presenta unas tasas de mortalidad de 29 %, nivel considerablemente más bajo. Así, los que procedían del núcleo AND-CAN son los que mayor nivel de supervivencia presentan respecto al total de individuos totales. Parece ser que la mejora genética realizada en el núcleo AND-CAN puede ser uno de los factores que esté causando que, indirectamente, y realizando selección de los individuos por crecimiento y ausencia de malformaciones se esté haciendo a los mismos más resistentes a dicho patógeno.

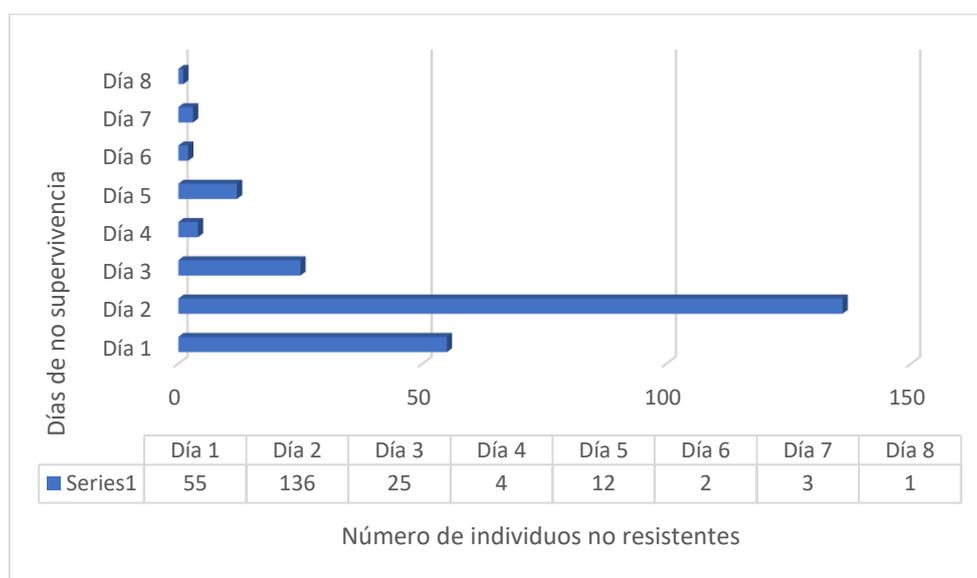


Ilustración 15. Individuos no resistentes por días de infección.

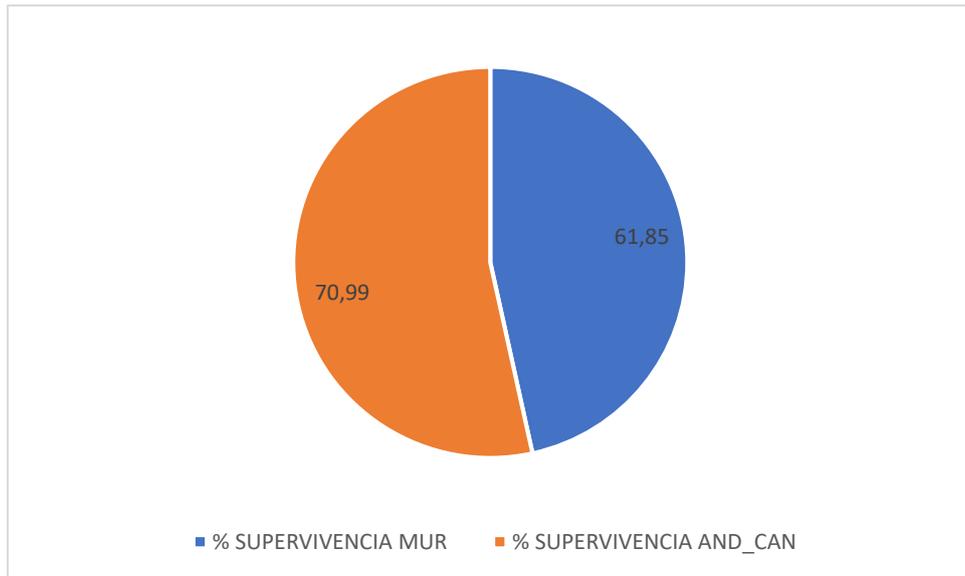


Ilustración 9. Variación de supervivencia respecto al origen.

Además, se realizó una comparativa de los individuos no resistentes y de la diferencia de pesos entre ellos, sabiendo que partimos con unos individuos en los cuales su peso oscila entre los 6,02 y 39,16 gramos. Se ha estimado, mediante estudios de frecuencia, que el rango de peso en el que se concentra la mayor tasa de mortalidad fue entre los 5 – 10 gramos. Es observable en la ilustración 17, que existe una relación entre los individuos de peso inferior y la susceptibilidad de infección. Así, conforme van aumentando de peso aumenta su resistencia a la infección.

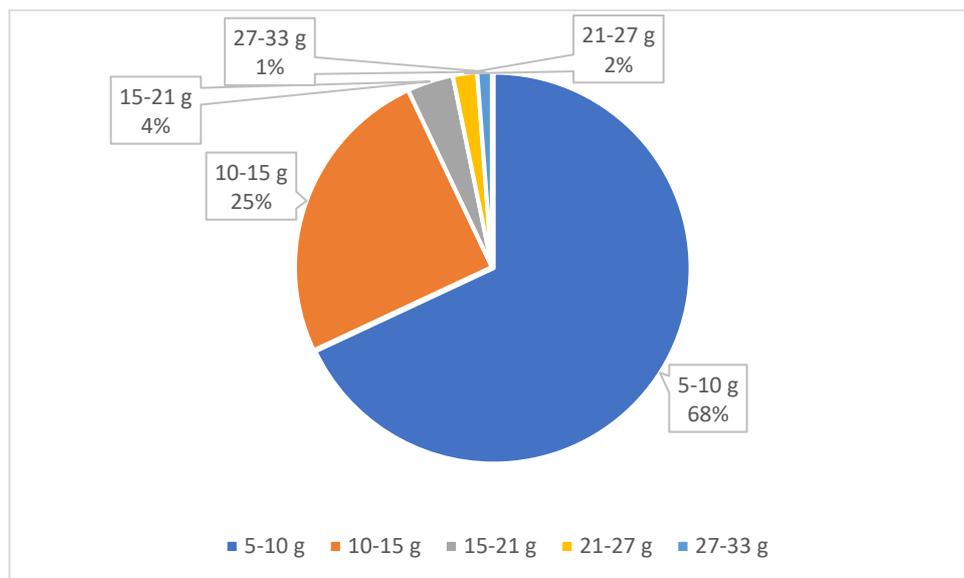


Ilustración 10. Efecto de la infección en los individuos en función del peso.

En lo referente a la respuesta inmunitaria por los niveles de inmonoglobulina M (IgM) y de peroxidasa de ambos orígenes.

Tanto para los valores de peroxidasa como de IgM, hemos estudiado la relación entre ambos y la resistencia de los individuos a la infección.

En la tabla 14, se muestran las medias de cada parámetro, tanto peroxidasa como Inmunoglobulina para las dos poblaciones. No existieron diferencias en los niveles de ambos indicadores en función del origen. Sin embargo, el peso mostró una tendencia ( $p = 0,08$ ) a reducir los niveles de IgM, de tal forma que por cada gramo que asciende el peso, la IgM descendió dos milésimas.

Tabla 14. Niveles de IgM y peroxidasa atendiendo a la susceptibilidad de la infección.

Efecto	IgM (O.D. 450nm)		Peroxidasa (UI/ml suero)	
	M ± SE	Pv	M ± SE	Pv
<b>Supervivientes</b>	0,272 ± 6*10 <sup>-4</sup>	a	27,87 ± 2,12	a
<b>Infectados</b>	0,27 ± 0'01	b	23,087 ± 3'31	b

S.E. Error estándar

En el estudio realizado por Cuesta *et al.* (2004) se muestra un estudio similar de los niveles de IgM en especímenes de dorada sometidos a dietas ricas en inmunoestimulantes sin exposición a ningún patógeno, y se observa que los rangos que presentan estos individuos son de 0,05 – 0,63, entre los que se encuentran las poblaciones de nuestro estudio.

#### 4.4. Análisis del efecto padre y madre.

Finalmente, para estudiar si existe una componente genética a la resistencia a *Photobacterium* hemos calculado el porcentaje de supervivencia por madre y padre para las poblaciones MUR y AND-CAN (anexos 3 y 4).

Si analizamos, en primer lugar, la mortalidad promedio por madre según origen fue de 51 % en MUR y 16 % en AND-CAN. La mortalidad promedio por padre fue para MUR 54 % y para AND-CAN 27 %. Aunque es resaltable el hecho de que la población MUR está formada igualmente por un mayor número de progenitores, y, por tanto, generan más descendencia, en AND-CAN se obtuvo menos descendencia por progenitor, pero se tuvo un éxito en supervivencia mayor.

Para determinar si existe un efecto del progenitor sobre la supervivencia de su descendencia se ha realizado un test chi cuadrado dentro de origen con los progenitores que tuvieron como mínimo 5 descendientes. Para el origen AND-CAN hubo 18 progenitores con más de 5 descendientes y se obtuvo un p valor para la chi cuadrado de 0,03, y para el origen MUR con 34 progenitores con más de 5 descendientes el p valor para la chi cuadrado fue 0,01. Es importante resaltar que el nivel de significación ejercido por el padre fue más considerable respecto al de la madre, ya que en este último el p valor resulta superior a 0,05. A partir de aquí podríamos dirigir cruzamientos entre los progenitores que tuvieron una menor tasa de mortalidad (Tablas 15 y 16)

En la línea AND-CAN, las hembras E56, y E15 han sido las más prolíficas, además de tener una descendencia con tasas de mortalidad considerablemente bajas (< 16% mortalidad promedio en hembras AND-CAN). Los machos E41 y E48, por otro lado, fueron igualmente los que tuvieron más descendientes con una alta resistencia a infección, inferior al 27 % del promedio de los padres AND-CAN.

Tabla 15. Los progenitores AND-CAN con menor tasa de mortalidad en sus descendientes

<b>Hembras</b>	Descendientes	Mortalidad (%)
<b>E56</b>	8	12,5
<b>E15</b>	7	14,29
<b>Machos</b>		
<b>E27</b>	7	14,29
<b>E48</b>	24	16,67
<b>E41</b>	21	19,05

Analizando a la población MUR (tabla 3), las hembras 82 y 30 son las que han mostrado valores de mortalidad inferiores a su promedio (51%), y la hembra 24 aunque presenta un valor ligeramente superior el número de descendientes que tuvo fue muy elevado. Por otro lado, los machos 68, 102, 55, 75 y 115 son los que presentan un valor de mortalidad inferior a su media (54%), aunque el 55 y 68 tuvieron menos descendencia. Es bastante interesante considerar las madres 24 y 57 y el macho 94 han contribuido bastante a la descendencia como en estudios anteriores, tales como en el TFM de Evlampiev-Armero (2019) y el de Vallecillos-Quijada (2018).

Tabla 16. Los progenitores MUR con menor tasa de mortalidad en sus descendientes

<b>Hembras</b>	Descendientes	Mortalidad (%)
<b>24</b>	31	54,8
<b>82</b>	11	45,5
<b>30</b>	8	12,5
<b>Machos</b>		
<b>68</b>	6	0
<b>102</b>	13	30,8
<b>55</b>	6	33
<b>75</b>	12	41,7
<b>115</b>	17	52,9

Para poder dar mejor respuesta a este apartado, se va a continuar el trabajo con estimas de heredabilidad del carácter cuando se disponga de más datos. Otros estudios (Valero *et al.*, 2018) analizan otras variables genéticas de los individuos, como la rapidez de actuación de los diferentes anticuerpos, y cuáles fueron los genes de actuación en la resistencia de nodavirus en lubina.

#### **4.5. Estudio técnico – económico sobre la creación de una línea genética resistente.**

El estudio técnico – económico es un proceso necesario para observar el impacto generado por las mejoras reflejadas en los proyectos de PROGENSA. En este trabajo, se realizará un estudio comparando los resultados obtenidos en PROGENSA I, expuestos en García-Celdrán *et al.*, 2015 para la población AND\_CAN\_F2 sometida a un proceso de selección genética de crecimiento y ausencia de anomalías. Serán empleados, también, los datos recopilados para la producción de dorada en jaula expuestos en Espinosa (2008).

Los datos de partida con los que se realizarán las modificaciones pertinentes son los costes incurridos para 1.500 toneladas/año (tabla 17), generados en este caso en producciones previas del marco PROGENSA (población F0 PI). En este caso, los importes totales fueron de 5.257.696,50 €, y los costes anuales se mantendrán iguales con la excepción de los de alimentación, que se adaptarán dependiendo de las modificaciones por mejoras en las tasas de mortalidad.

Si se realiza una comparativa en cuanto a la producción mejorada de alevines procedente de AND-CAN, y considerando una disminución de mortalidad de casi 30 %, los costes de alimentación se verían incrementados para cubrir las necesidades del aumento de la producción y habría, por tanto, un incremento de la producción del 30 %, equivaliendo a una producción de 1950 toneladas / año (tabla 18).

Tabla 17. Distribución de costes para una explotación de engorde de 1500 t de dorada en jaula.

	<b>Coste (€/año) para 1500 toneladas/año</b>	<b>Porcentaje sobre el coste total</b>
<b>Personal</b>	497.200,00	9'5
<b>Alevines</b>	1.843.776,00	35'1
<b>Alimentación</b>	2.013.224,00	38'3
<b>Generales</b>	653.130,00	12'4
<b>Amortización</b>	250.366,50	4'8
<b>Total</b>	<b>5.257.696,50</b>	<b>100</b>

*Fuente: Espinosa 2008.*

Los costes de alimentación se verían incrementados, tal y como se expone en la tabla 15, hasta un total de 2.617.191,2 €.

Tabla 18. Distribución de costes para una explotación de engorde de 1950 t de dorada en jaula.

	<b>Coste (€/año) para 1950 toneladas/año</b>	<b>Porcentaje sobre el coste total</b>
<b>Personal</b>	497.200,00	8,5
<b>Alevines</b>	1.843.776,00	31,5
<b>Alimentación</b>	2.617.191,2	44,6
<b>Generales</b>	653.130,00	11,1
<b>Amortización</b>	250.366,50	4,3
<b>Total</b>	<b>5.257.696,50</b>	<b>100</b>

Tabla 19. Beneficios para ambas producciones, con selección y sin selección.

<b>Parámetros productivos</b>	<b>Gastos</b>	<b>Ingresos</b>	<b>Beneficios</b>
<b>Producción sin selección (1.500 t)</b>	5.257.696,5	6.270.000	1.012.303,5
<b>Mejora en resistencia a <i>Photobacterium</i> (30 %) (1.950 t)</b>	5.861.663,7	8.151.000	2.289.336,3

Precio de venta de la dorada 4,18€/kg

Una vez analizados y considerados los datos expuestos, se refleja la importante diferencia en beneficio económico, resultando en casi 1.277.032,8 € más (tabla 19), que supone un incremento de más del doble respecto al valor inicial.

Como resulta obvio en los datos expuestos, la implantación de dichas mejoras en cuanto a resistencia de las nuevas poblaciones resulta en un impacto económico positivo, una optimización de los recursos y mejores características productivas.

## 5. CONCLUSIONES

Se establecieron dos líneas genéticas de *Sparus aurata*, una de origen andaluz y canario seleccionada durante dos generaciones por crecimiento y ausencia de malformaciones, y otra de origen murciano. Los descendientes de los progenitores AND-CAN pesaron un 14% más que los MUR

Las poblaciones de reproductores y de los descendientes de ambas líneas genéticas fueron caracterizadas genéticamente mediante una multiplex de once microsatélites. Las heterocigosidades observadas en las poblaciones de los descendientes descendieron ligeramente respecto a las poblaciones de los reproductores respectivas. Las diferencias en cuanto al polimorfismo genético de estas poblaciones y las realizadas previamente en el marco PROGENSA (Lee-Montero *et al.*, 2013) son considerables, ya que los alelos más polimórficos han sido, en ambas poblaciones, el 5M y el C3, mientras que para este estudio fueron A5 y E1.

En cuanto a la resistencia a *Photobacterium damsela*, se ha observado un efecto del origen. En la línea AND-CAN presentó unos porcentajes de supervivencia de casi un 70 %, y casi una diferencia de un 10 % respecto a la población proveniente de la línea MUR. Además, se observó que la mortalidad descendía a partir de los 20 gramos de

peso de los alevines teniendo lugar la mortalidad mayoritariamente el día 2 y 3 post-infección.

Por otro lado, en lo que respecta al efecto genético padre/madre sobre la supervivencia de la descendencia se observó un efecto significativo por lo que parece ser un carácter que se pueda mejorar mediante selección genética. Además, si tenemos en cuenta que la selección que se realiza actualmente es a favor de crecimiento, esto supondría una doble ventaja a la hora de buscar una línea genética resistente a *Photobacterium*.

En el estudio económico realizado, se muestra como un incremento en la producción de un 30% usando líneas genéticas más resistentes a *Photobacterium* supone incrementar el beneficio económico en más del doble del valor inicial.

En conclusión, profundizar en el marco PROGENSA en la búsqueda de líneas genéticas en dorada que además de sus mejores caracteres de crecimiento sean resistentes a *Photobacterium damselae* es de gran interés tanto por el beneficio económico que supone como por la reducción de impacto ambiental que puede conllevar.

## 6. BIBLIOGRAFÍA

APROMAR 2019. La acuicultura marina de peces en España.

Baptista, T., Costa, J., Soares, F. (1998). Patologías más comunes en Dorada (*Sparus aurata*) y Lubina (*Dicentrarchus labrax*) registradas en piscifactorías al sur del Río Tajo durante 1998. CCMAR, Universidade do Algarve.

Cuesta, A., Meseguer, J., & Esteban, M. A. (2004). Total serum immunoglobulin M levels are affected by immunomodulators in seabream (*Sparus aurata* L.). *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 101(3-4), 203-210. <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2004.04.021>

Díaz-Rosales, P., Salinas, I., Rodríguez, A., Cuesta, A., Chabrilón, M., Balebona, M. C., Moriñigo, M. Á., Esteban, M. Á., & Meseguer, J. (2006). Gilthead seabream (*Sparus aurata* L.) innate immune response after dietary administration of heat-inactivated potential probiotics. *Fish & Shellfish Immunology*, 20(4), 482-492. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2005.06.007>

Espinosa González, MJ., Instalación de una planta de producción acuícola en el polígono de cultivos marinos de San Pedro del Pinatar para una producción de dorada y lubina. Octubre de 2008. Proyecto Fin de Carrera. Universidad Politécnica de Cartagena.

Evlampiev Armero, A. (2019). Trabajo Fin de Master en Técnicas Avanzadas en Investigación y Desarrollo Agrario y Alimentario (TAIDAA). Mejora de la competitividad del sector de ladorada a través de la selección genética (PROGENSA III): Establecimiento de un núcleo de reproductores de origen Murcia.

Ortega, A., 2008. Cultivo de Dorada. Madrid, Fundación OESA.

Ho, L.-P., Lin, J. H.-Y., Liu, H.-C., Chen, H.-E., Chen, T.-Y., & Yang, H.-L. (2011). Identification of antigens for the development of a subunit vaccine against *Photobacterium damsela* ssp. *Piscicida*. *Fish & shellfish immunology*, 30(1), 412–419.

Kissil, G. W., Lupatsch, I., Elizur, A., & Zohar, Y. (2001). Long photoperiod delayed spawning and increased somatic growth in gilthead seabream. 17.

Lee-Montero, I., Navarro, A., Borrell, Y., García-Celdrán, M., Martín, N., Negrín-Báez, D., Blanco, G., Armero, E., Berbel, C., Zamorano, M. J., Sánchez, J. J., Estévez, A., Ramis, G., Manchado, M., & Afonso, J. M. (2013). Development of the first standardised panel of two new microsatellite multiplex PCRs for gilthead seabream (*Sparus aurata* L.). *Animal Genetics*, 44(5), 533-546. <https://doi.org/10.1111/age.12037>

Linnaeus, 1758. FAO Fisheries & Aquaculture—Programa de información de especies acuáticas—*Sparus aurata*

López-Dóriga, M. V., Barnes, A. C., dos Santos, N. M. S., & Ellis, A. E. (2000). Invasion of fish epithelial cells by *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*: Evidence for receptor specificity, and effect of capsul and serum. *Microbiology*, 146(1), 21-3'. <https://doi.org/10.1099/00221287-146-1-21>

- Navarro-Flores, J., Ibarra-Castro, L., Martínez-Brown, J. M., Zavala-Leal, O. I., Navarro-Flores, J., Ibarra-Castro, L., Martínez-Brown, J. M., & Zavala-Leal, O. I. (2019). Hermafroditismo en peces teleósteos y sus implicaciones en la acuicultura comercial. *Revista de biología marina y oceanografía*, *54*(1), 1-10. <https://doi.org/10.22370/rbmo.2019.54.1.1427>
- Romalde, J. L. (2002). *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*: An integrated view of a bacterial fish pathogen. *International Microbiology*, *5*(1), 3–9.
- PROGENSA, 2017. Mejora de la competitividad del sector de la dorada a través de la selección genética (PROGENSA-III). Informe anual de seguimiento científico-técnico. Ministerio del Medio Ambiente, Rural y Marino (MARM).
- Thune, R. L., Stanley, L. A., & Cooper, R. K. (1993). Pathogenesis of gram-negative bacterial infections in warmwater fish. *Annual Review of Fish Diseases*, *3*, 37-68. [https://doi.org/10.1016/0959-8030\(93\)90028-A](https://doi.org/10.1016/0959-8030(93)90028-A)
- Valero, Y., Mokrani, D., Chaves-Pozo, E., Arizcun, M., Oumouna, M., Meseguer, J., Esteban, M. Á., & Cuesta, A. (2018). Vaccination with UV-inactivated nodavirus partly protects European sea bass against infection, while inducing few changes in immunity. *Developmental & Comparative Immunology*, *86*, 171-179. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2018.05.013>
- Vallecillos-Quijada, . (2018). Trabajo Fin de Master en Técnicas Avanzadas en Investigación y Desarrollo Agrario y Alimentario (TAIDAA). Efecto del proceso de selección en dorada (*Sparus aurata* L.) sobre la variabilidad genética de la resistencia a *Photobacterium damsela* subespecie *piscida*.
- Wang, R., Feng, J., Su, Y., Ye, L., & Wang, J. (2013). Studies on the isolation of *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* from diseased golden pompano (*Trachinotus ovatus* Linnaeus) and antibacterial agents sensitivity. *Veterinary microbiology*, *162*(2-4), 957–963.

## 7. ANEXO: EFECTO PADRE/MADRE SOBRE LA MORTALIDAD EN LA POBLACIÓN MURCIA

### 7.1. Efecto madre en MURCIA. Porcentaje de mortalidad de la descendencia por progenitor

<b>Hembras MURCIA</b>	<b>Total descendientes</b>	<b>Total de supervivientes</b>	<b>Total de fallecidos</b>	<b>% mortalidad</b>
24	31	14	17	54,8
57	16	5	11	68,8
32	11	3	8	72,7
82	11	6	5	45,5
30	8	7	1	12,5
67	7	1	6	85,7
25	7	3	4	57,1
34	6	3	3	50,0
136	6	4	2	33,3
23	5	1	4	80,0
27	5	1	4	80,0
14	5	2	3	60,0
15	5	2	3	60,0
21	5	2	3	60,0
13	5	3	2	40,0
92	5	4	1	20,0
2	4	1	3	75,0
3	4	1	3	75,0
54	4	2	2	50,0
105	4	3	1	25,0
31	3	1	2	66,7
73	3	1	2	66,7
78	3	1	2	66,7
110	3	1	2	66,7
17	3	2	1	33,3
36	3	2	1	33,3
43	3	2	1	33,3
88	3	2	1	33,3
28	2	0	2	100,0
66	2	0	2	100,0
91	2	0	2	100,0
5	2	1	1	50,0
20	2	1	1	50,0
123	2	1	1	50,0

<b>142</b>	2	1	1	50,0
<b>22</b>	2	2	0	0,0
<b>1</b>	1	0	1	100,0
<b>4</b>	1	0	1	100,0
<b>7</b>	1	0	1	100,0
<b>8</b>	1	0	1	100,0
<b>26</b>	1	0	1	100,0
<b>47</b>	1	0	1	100,0
<b>56</b>	1	0	1	100,0
<b>124</b>	1	0	1	100,0
<b>130</b>	1	0	1	100,0
<b>132</b>	1	0	1	100,0
<b>134</b>	1	0	1	100,0
<b>42</b>	1	1	0	0,0
<b>45</b>	1	1	0	0,0
<b>52</b>	1	1	0	0,0
<b>62</b>	1	1	0	0,0
<b>71</b>	1	1	0	0,0
<b>76</b>	1	1	0	0,0
<b>101</b>	1	1	0	0,0
<b>103</b>	1	1	0	0,0
<b>125</b>	1	1	0	0,0
<b>135</b>	1	1	0	0,0
<b>143</b>	1	1	0	0,0
		88	21	-

**7.2. Efecto madre en MURCIA. Porcentaje de mortalidad de la descendencia respecto a cada progenitor en los días de infección.**

<b>Hembras MURCIA</b>	<b>Porcentaje de fallecimiento en los días de infección</b>							
	1,00	2,00	3,00	4,00	5,00	6,00	7,00	9,00
1	-	100,00	-	-	-	-	-	-
2	50,00	25,00	-	-	-	-	-	25,00
3	-	50,00	16,67	-	16,67	-	-	16,67
4	100,00	-	-	-	-	-	-	-
5	-	50,00	-	-	-	-	-	50,00
7	-	100,00	-	-	-	-	-	-
8	-	-	100,00	-	-	-	-	-
13	-	40,00	-	-	-	-	-	60,00
14	-	16,67	16,67	-	-	16,67	-	50,00
15	-	60,00	-	-	-	-	-	40,00
17	-	33,33	-	-	-	-	-	66,67
20	-	50,00	-	-	-	-	-	50,00
21	20,00	40,00	-	-	-	-	-	40,00
22	-	-	-	-	-	-	-	100,00
23	-	40,00	-	-	20,00	-	20,00	20,00
24	25,00	18,75	6,25	-	3,13	-	-	46,88
25	14,29	28,57	-	14,29	-	-	-	42,86
26	33,33	33,33	-	-	-	-	-	33,33
27	40,00	-	20,00	20,00	-	-	-	20,00
28	-	50,00	-	-	50,00	-	-	-
30	-	12,50	-	-	-	-	-	87,50
31	33,33	33,33	-	-	-	-	-	33,33
32	18,18	27,27	27,27	-	-	-	-	27,27
34	-	50,00	-	-	-	-	-	50,00
36	-	33,33	-	-	-	-	-	66,66
42	-	-	-	-	-	-	-	100,00
43	-	-	33,33	-	-	-	-	66,66
45	-	-	-	-	-	-	-	100,00
47	-	100,00	-	-	-	-	-	-
52	-	-	-	-	-	-	-	100,00

<b>54</b>	25,00	25,00	-	-	-	-	-	50,00
<b>56</b>	-	100,00	-	-	-	-	-	-
<b>57</b>	17,65	41,18	5,88	-	-	-	-	35,29
<b>62</b>	-	-	-	-	-	-	-	100,00
<b>66</b>	-	50,00	-	-	-	-	50,00	-
<b>67</b>	12,50	62,50	-	-	12,50	-	-	12,50
<b>71</b>	-	-	-	-	-	-	-	100,00
<b>73</b>	-	-	33,33	-	33,33	-	-	33,33
<b>76</b>	-	-	-	-	-	-	-	100,00
<b>78</b>	-	25,00	-	-	25,00	-	-	50,00
<b>82</b>	8,33	33,33	-	-	-	-	-	58,33
<b>88</b>	-	33,33	-	-	-	-	-	66,66
<b>91</b>	-	66,66	-	-	33,33	-	-	-
<b>92</b>	-	20,00	-	-	-	-	-	80,00
<b>101</b>	-	-	-	-	-	-	-	100,00
<b>103</b>	-	-	-	-	-	-	-	100,00
<b>105</b>	-	-	25,00	-	-	-	-	75,00
<b>110</b>	25,00	25,00	-	-	25,00	-	-	25,00
<b>123</b>	-	50,00	-	-	-	-	-	50,00
<b>124</b>	100,00	-	-	-	-	-	-	-
<b>125</b>	-	-	-	-	-	-	-	100,00
<b>130</b>	100,00	-	-	-	-	-	-	-
<b>132</b>	100,00	-	-	-	-	-	-	-
<b>134</b>	-	100,00	-	-	-	-	-	-
<b>135</b>	-	-	-	-	-	-	-	100,00
<b>136</b>	16,67	-	16,66	-	-	-	-	66,67
<b>142</b>	-	50,00	-	-	-	-	-	50,00
<b>143</b>	-	-	-	-	-	-	-	100,00

### 7.3. Efecto padre en MURCIA. Porcentaje de mortalidad de la descendencia por progenitor

<b>Machos MURCIA</b>	<b>Total descendientes</b>	<b>Total de supervivientes</b>	<b>Total de fallecidos</b>	<b>% Mortalidad</b>
115	17	8	9	52,94
87	17	6	11	64,71
118	14	4	10	71,43
102	13	9	4	30,77
75	12	7	5	41,67
104	10	3	7	70
61	10	5	5	50
131	9	3	6	66,67
63	9	3	6	66,67
46	8	3	5	62,5
77	6	2	4	66,67
68	6	6	0	0
55	6	4	2	33,33
16	6	0	6	100
138	5	4	1	25
126	5	2	3	60
109	5	3	2	66,67
96	5	0	5	100
41	5	2	3	60
110	4	2	2	50
107	4	0	4	100
98	4	0	4	100
133	3	0	3	100
113	3	1	2	66,67
72	3	3	0	0
58	3	2	1	33,33
10--	2	2	0	0
122	2	1	1	50
117	2	2	0	0
106	2	2	0	0
86	2	1	1	50
60	2	0	2	100
29	2	1	1	50
1541	1	1	0	0
137	1	0	1	100
114	1	0	1	100
94	1	0	1	100
79	1	1	0	0

<b>74</b>	1	1	0	0
<b>69</b>	1	1	0	0
<b>53</b>	1	0	1	100

**7.4. Efecto padre en MURCIA. Porcentaje de mortalidad de la descendencia respecto a cada progenitor en los días de infección**

<b>Machos MURCIA</b>	<b>Porcentaje de fallecimiento en los días de infección</b>							
	1,00	2,00	3,00	4,00	5,00	6,00	7,00	9,00
<b>16</b>	16,67	33,33	17,00	-	17,00	-	17,00	-
<b>29</b>	-	50,00	-	-	-	-	-	50,00
<b>41</b>	20,00	40,00	-	-	-	-	-	40,00
<b>46</b>	12,50	50,00	-	-	-	-	-	37,50
<b>53</b>	-	-	-	-	100,00	-	-	-
<b>55</b>	33,33	-	-	-	-	-	-	66,67
<b>58</b>	-	33,33	-	-	-	-	-	66,67
<b>60</b>	-	-	-	-	100,00	-	-	-
<b>61</b>	20,00	20,00	-	-	-	-	10,00	50,00
<b>63</b>	-	22,22	11,11	11,00	11,00	11,00	-	33,33
<b>68</b>	-	-	-	-	-	-	-	100,00
<b>69</b>	-	-	-	-	-	-	-	100,00
<b>72</b>	-	-	-	-	-	-	-	100,00
<b>74</b>	-	-	-	-	-	-	-	100,00
<b>75</b>	16,67	16,67	8,33	-	-	-	-	58,33
<b>77</b>	16,67	33,33	17,00	-	-	-	-	33,00
<b>79</b>	-	-	-	-	-	-	-	100,00
<b>86</b>	-	50,00	-	-	-	-	-	50,00
<b>87</b>	35,29	11,76	12,00	-	5,88	-	-	35,29
<b>94</b>	-	100,00	-	-	-	-	-	-
<b>96</b>	20,00	60,00	-	20,00	-	-	-	-
<b>98</b>	-	75,00	25,00	-	-	-	-	-
<b>102</b>	7,69	23,08	-	-	-	-	-	69,23
<b>104</b>	-	60,00	-	-	10,00	-	-	30,00
<b>106</b>	-	-	-	-	-	-	-	100,00
<b>107</b>	-	75,00	25,00	-	-	-	-	-
<b>109</b>	-	40,00	-	-	-	-	-	60,00

<b>110</b>	25,00	-	25,00	-	-	-	-	50,00
<b>113</b>	-	-	33,33	-	33,00	-	-	33,00
<b>114</b>	-	100,00	-	-	-	-	-	-
<b>115</b>	-	41,18	11,76	-	-	-	-	47,06
<b>117</b>	-	-	-	-	-	-	-	100,00
<b>118</b>	35,71	28,57	7,14	-	-	-	-	28,57
<b>122</b>	-	50,00	-	-	-	-	-	50,00
<b>126</b>	-	60,00	-	-	-	-	-	40,00
<b>131</b>	22,22	44,44	-	-	-	-	-	33,33
<b>133</b>	66,67	-	33,33	-	-	-	-	-
<b>137</b>	-	100,00	-	-	-	-	-	-
<b>138</b>	20,00	-	-	-	-	-	-	80,00
<b>1541</b>	-	-	-	-	-	-	-	100,00
<b>10--</b>	0	0	0	0	0	0	0	100

## ANEXO 8. EFECTO PADRE/MADRE EN LA POBLACIÓN AND\_CAN

### 8.1. Efecto madre en AND\_CAN. Porcentaje de mortalidad de la descendencia por progenitor.

Hembras IFAPA	Total descendientes	Total de supervivientes	Total de infectados	% mortalidad
E24	9	6	3	33,33
E11	8	6	2	25
E56	8	7	1	12,5
E15	7	6	1	14,29
E18	7	3	4	57,14
E57	7	4	3	42,86
E44	5	5	0	0
E6	5	2	3	60
E8	5	4	1	20
E22	4	1	3	75
E39	4	4	0	0
E4	4	1	3	75
E5	4	4	0	0
E2	3	3	0	0
E20	3	3	0	0
E30	3	3	0	0
E50	3	3	0	0
E52	3	2	1	33,33
E12	2	2	0	0
E13	2	1	1	50
E16	2	1	1	50
E19	2	2	0	0
E3	2	2	0	0
E31	2	2	0	0
E33	2	2	0	0
E51	2	2	0	0
E55	2	2	0	0
E10	1	1	0	0
E26	1	1	0	0
E28	1	1	0	0
E36	1	1	0	0
E37	1	1	0	0
E40	1	1	0	0
E54	1	1	0	0

**8.2. Efecto madre en IFAPA. Porcentaje de mortalidad de la descendencia respecto a cada progenitor en los días de infección.**

Hembras IFAPA	Porcentaje de fallecimiento en los días de infección							
	1,00	2,00	3,00	4,00	5,00	6,00	7,00	9,00
E10	0	0	0	0	0	0	0	100
E11	0	0	0	13	13	0	0	75
E12	0	0	0	0	0	0	0	100
E13	0	0	50	0	0	0	0	50
E15	0	0	0	0	0	0	0	100
E16	0	0	50	0	0	0	0	50
E18	0	14	14	0	0	14	0	57
E19	0	0	0	0	0	0	0	100
E2	0	0	0	0	0	0	0	100
E20	0	0	0	0	0	0	0	100
E22	0	0	75	0	0	0	0	25
E24	10	10	10	0	0	0	0	70
E26	0	0	0	0	0	0	0	100
E28	0	0	0	0	0	0	0	100
E3	0	0	0	0	0	0	0	100
E30	0	0	0	0	0	0	0	100
E31	0	0	0	0	0	0	0	100
E33	0	0	0	0	0	0	0	100
E36	0	0	0	0	0	0	0	100
E37	0	0	0	0	0	0	0	100
E39	0	0	0	0	0	0	0	100
E4	0	50	25	0	0	0	0	25
E40	0	0	0	0	0	0	0	100
E44	0	0	0	0	0	0	0	100
E5	0	0	0	0	0	0	0	100
E50	0	0	0	0	0	0	0	100
E51	0	0	0	0	0	0	0	100

<b>E52</b>	0	0	33	0	0	0	0	67
<b>E54</b>	0	0	0	0	0	0	0	33
<b>E55</b>	0	0	0	0	0	0	0	100
<b>E56</b>	11	11	0	0	0	0	0	78
<b>E57</b>	0	14	14	0	0	0	0	71
<b>E6</b>	0	40	20	0	0	0	0	2

### 8.3. Efecto padre en IFAPA. Porcentaje de mortalidad de la descendencia por progenitor.

<b>Machos IFAPA</b>	<b>Total de descendientes</b>	<b>Total de supervivientes</b>	<b>Total de infectados</b>	<b>% mortalidad</b>
<b>E48</b>	24	20	4	16,67
<b>E41</b>	21	17	4	19,05
<b>E28</b>	15	11	4	26,67
<b>E17</b>	11	8	3	27,27
<b>E34</b>	9	6	3	33,33
<b>E14</b>	8	6	2	25
<b>E27</b>	7	6	1	14,29
<b>E29</b>	5	4	1	20
<b>E43</b>	5	3	2	40
<b>E23</b>	4	2	2	50
<b>E45</b>	3	3	0	0
<b>E35</b>	2	2	0	0
<b>E46</b>	2	2	0	0
<b>E4</b>	1	0	1	100

**8.4. Efecto padre en IFAPA. Porcentaje de mortalidad de la descendencia respecto a cada progenitor en los días de infección.**

Machos IFAPA	Días de exposición a la infección							
	1	2	3	4	5	6	7	9
E14	0	0	25	0	0	0	0	75
E17	0	0	9	9	9	0	0	73
E23	0	25	0	0	0	0	0	75
E27	0	0	0	0	0	0	0	100
E28	0	20	7	0	0	0	0	73
E29	0	0	20	0	0	0	0	80
E34	0	25	0	0	0	0	0	75
E35	0	0	0	0	0	0	0	100
E4	0	0	0	0	0	0	0	100
E41	9	0	13	0	0	4	0	74
E43	0	20	20	0	0	0	0	60
E45	0	0	0	0	0	0	0	100
E46	0	0	0	0	0	0	0	100
E48	0	8	8	0	0	0	0	83

## ANEXO 9. Tabla chi cuadrado para los parentales AND-CAN

	<b>Total</b>	<b>Vivos</b>	<b>Muertos observados</b>	<b>Esperados</b>	<b>Mortalidad</b>	
E24	9	6	3	2,27710843	33,33	0,22948939
E11	8	6	2	2,02409639	25	0,00028686
E56	8	7	1	2,02409639	12,5	0,518144
E15	7	6	1	1,77108434	14,29	0,33571019
E18	7	3	4	1,77108434	57,14	2,80509794
E57	7	4	3	1,77108434	42,86	0,85271699
E44	5	5	0	1,26506024	0	1,26506024
E6	5	2	3	1,26506024	60	2,37934596
E8	5	4	1	1,26506024	20	0,05553643
E48	24	20	4	6,07228916	16,67	0,70720979
E41	21	17	4	5,31325301	19,05	0,32459088
E28	15	11	4	3,79518072	26,67	0,01105374
E17	11	8	3	2,78313253	27,27	0,01689876
E34	9	6	3	2,27710843	33,33	0,22948939
E14	8	6	2	2,02409639	25	0,00028686
E27	7	6	1	1,77108434	14,29	0,33571019
E29	5	4	1	1,26506024	20	0,05553643
E43	5	3	2	1,26506024	40	0,426965
	166	124	42		chi2	10,549129
			0,25301205		gl	18
					p valor	0,03803891

**ANEXO 10. Tabla chi cuadrado para los parentales MUR**

	Total	Vivos	Muertos observados	Esperados	Mortalidad	
115	17	8	9	9,5	52,94	0,02631579
87	17	6	11	9,5	64,71	0,23684211
118	14	4	10	7,8235294	71,43	0,6054843
102	13	9	4	7,2647059	30,77	1,46713503
75	12	7	5	6,7058824	41,67	0,43395253
104	10	3	7	5,5882353	70	0,35665635
61	10	5	5	5,5882353	50	0,0619195
131	9	3	6	5,0294118	66,67	0,1873065
63	9	3	6	5,0294118	66,67	0,1873065
46	8	3	5	4,4705882	62,5	0,0626935
77	6	2	4	3,3529412	66,67	0,124871
68	6	6	0	3,3529412	0	3,35294118
55	6	4	2	3,3529412	33,33	0,54592363
16	6	0	6	3,3529412	100	2,08978328
138	5	4	1	2,7941176	25	1,15201238
126	5	2	3	2,7941176	60	0,01517028
109	5	3	2	2,7941176	66,67	0,22569659
96	5	0	5	2,7941176	100	1,74148607
41	5	2	3	2,7941176	60	0,01517028
24	31	14	17	17,323529	54,8	0,00604215
57	16	5	11	8,9411765	68,8	0,47407121
32	11	3	8	6,1470588	72,7	0,55854208
82	11	6	5	6,1470588	45,5	0,21404447
30	8	7	1	4,4705882	12,5	2,69427245
67	7	1	6	3,9117647	85,7	1,11477222
25	7	3	4	3,9117647	57,1	0,00199027
34	6	3	3	3,3529412	50,0	0,0371517
136	6	4	2	3,3529412	33,3	0,54592363
23	5	1	4	2,7941176	80,0	0,52043344
27	5	1	4	2,7941176	80,0	0,52043344
14	5	2	3	2,7941176	60,0	0,01517028
15	5	2	3	2,7941176	60,0	0,01517028
21	5	2	3	2,7941176	60,0	0,01517028
13	5	3	2	2,7941176	40,0	0,22569659
92	5	4	1	2,7941176	20,0	1,15201238
	306	135	171		Chi cuadrado	20,9995637
			0,55882353		gl	34
					P valor	0,01436275

