



New species for EU aquaculture

Manual técnico – Corvina (*Argyrosomus regius*)

Líder de la especie: Alicia Estevez, (IRTA, Spain),

Otros científicos participantes: Mylonas, Constantinos C., Papandroulakis, Nikos, Papadakis, Ioannis (HCMR, Greece), Fauvel, Christian (IFREMER, France), Duncan, Neil (IRTA, Spain), Covadonga Rodríguez (Universidad de La Laguna, Spain), Luis Guerrero (IRTA, Spain), Ricard Bou (IRTA, Spain), Robles, Rocio (CTAQUA, Spain).



DIVERSIFY 2018

QR Code



ÍNDICE DE CONTENIDOS

INTRODUCCIÓN	3
1. REPRODUCCIÓN Y GENÉTICA	4
EVALUACIÓN DE LAS VARIACIONES GENÉTICAS EN REPRODUCTORES EN CAUTIVIDAD.....	4
DESARROLLO DE PROTOCOLOS PARA CRUCES POR PAREJAS EN DESOVE ESPONTÁNEO.....	6
DESCRIPCIÓN DE CARACTERÍSTICAS DEL ESPERMA Y MÉTODOS DE CRIOPRESERVACIÓN.....	12
DESARROLLO DE MÉTODOS DE FERTILIZACIÓN IN VITRO PARA CRUCES PROGRAMADOS.....	15
2. NUTRICION	19
AVANCES EN LA NUTRICIÓN DE LARVAS Y JUVENILES.....	19
3. CRÍA LARVARIA	28
CONDICIONES ÓPTIMAS PARA LA CRÍA LARVARIA.....	¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.
4. ENGORDE	34
METODOLOGÍA PARA PREVENIR DISPERSION DE TALLAS EN JUVENILES DE CORVINA.....	34
EL EFECTO DE LA PROFUNDIDAD DE LOS VIVEROS E INTENSIDAD DE LUZ SOBRE EL CRECIMIENTO.....	43
DESARROLLO DE METODOLOGÍA DE ALIMENTACIÓN.....	49
<i>El efecto de varios estímulos sobre el comportamiento alimentario</i>	49
<i>El efecto de métodos de distribución de comida</i>	51
<i>Comparación entre alimentación automática y a demanda en tanques</i>	54
5. SALUD DE LOS PECES	58
GRANULOMATOSIS SISTÉMICA.....	58
DERMATOPATÍA ULCERATIVA CRÓNICA (CUD) EN CORVINA.....	67
TEMAS DE SALUD DE LOS PECES Y TRATAMIENTOS ANTIPARASITARIOS.....	70
6. MERCADO, PERCEPCIÓN DEL CONSUMIDOR, NUEVOS PRODUCTOS Y	
MODELOS DE NEGOCIO	74
REFERENCIAS	76



Introducción

La corvina habita en el Mediterráneo y el Mar Negro, y en la costa este del Atlántico (Haffray et al., 2012). Tiene atributos atractivos para el mercado que incluyen gran tamaño, buen rendimiento, bajo contenido de grasa, excelente sabor y textura firme (Monfort, 2010). La especie también tiene las características biológicas requeridas para la acuicultura comercial utilizando tecnologías de cultivo bien establecidas (Papadakis et al., 2013). Estas características incluyen un rápido crecimiento de ~ 1 Kg por año (Duncan et al., 2013), un bajo índice de conversión de alimentación de 0.9-1.2, que es similar a la cría de larvas relativamente fácil del salmón del Atlántico (Roo et al., 2010). Vallés y Estévez, 2015) (Duncan et al., 2018, Mylonas et al., 2016). La corvina se produjo por primera vez en 1997 en un criadero comercial en Francia y desde entonces ha exhibido aumentos de producción anuales hasta 7 veces más (FAO, 2012). En 2016, la producción acuícola europea fue de 7,280 t, producida en España, Grecia, Turquía, Francia, Portugal, Italia, Chipre y Croacia (FAO, 2018).



Una encuesta a productores de corvina identificó los principales cuellos de botella para la expansión de la industria. En primer lugar, las tasas de crecimiento variables, cuya causa exacta no es obvia, son un rendimiento de mejora importante (Duncan et al., 2013). Se requiere un enfoque multidisciplinario para examinar el papel de la genética, la nutrición, especialmente los requisitos dietéticos durante el destete, el preengorde y el cultivo en viveros, el comportamiento de alimentación y la crianza. En segundo lugar, la distribución de esta especie en la región de los Estados Unidos, que puede ser una de varias fuentes (principalmente un criadero en Francia). Esto tendrá implicaciones negativas significativas para el futuro de la cría, que son necesarias para pasar al siguiente nivel de eficiencia y producción. En tercer lugar, las enfermedades emergentes, las enfermedades parasitarias y la gran aparición de granulomas sistémicos, que pueden haberse desarrollado para este pez. Finalmente, los factores socioeconómicos se han identificado como cuellos de botella, incluida la necesidad de un mercado más amplio y la diversificación de productos (Monfort, 2010) más allá del pescado fresco en su totalidad. Las iniciativas nacionales para la domesticación propia están en marcha en España y Grecia, coordinadas por Partners of the Consortium, y DIVERSIFY se desarrollará aún más.

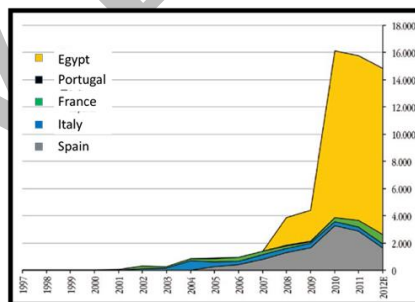


Figura 1. Evolución de la producción acuícola de corvina en Europa y Egipto desde 1997 hasta 2012.

En el presente Manual Técnico, proporcionamos la información obtenida durante los 5 años del proyecto DIVERSIFY, relevante para la adquisición de nuevos reproductores, la gestión de reproductores y el control de la reproducción, la nutrición, la cría de larvas y la cría de animales. Esta información está dirigida a organizaciones comerciales y de investigación, que están interesadas en investigar el potencial de la corvina para la acuicultura. Más información estará disponible en un futuro cercano, ya que la publicación se publicará en el sitio web del proyecto (www.diversifyfish.eu).



1. Reproducción y Genética

Evaluación de las variaciones genéticas en reproductores en cautividad

(Dirigido por FCPCT, Juan Manuel Afonso)

La variación genética en la población basal es importante debido a la variación en el tamaño (Falconer y Mackay, 2001). Las poblaciones silvestres de corvina han sido estudiadas por Haffray et al. (2012), en términos de diferenciación genética a lo largo del Océano Atlántico y el Mar Mediterráneo, utilizando marcadores de microsatélite de corvina roja (*Sciaenops ocellatus*) (Renshaw et al., 2006). Estos autores encontraron un promedio de 13.2 y 0.57 para los alelos y la heterocigosidad observada, respectivamente. Por lo tanto, los autores estimaron que la corvina tiene al menos dos grupos genéticos muy diferentes: el Atlántico y el Mediterráneo, en un contexto de seis áreas de desove independientes, donde se reportó una menor riqueza alélica y tamaños efectivos de las poblaciones mediterráneas. Esta estructuración estuvo relacionada principalmente con las fases interglaciales del Cuaternario. Haffray et al. (2014) utilizaron el mismo múltiplex de microsatélites (Panels-A & -B) e informaron una variación genética similar, pero ligeramente inferior, en dos poblaciones domésticas de corvina de Francia (LPDS y FMD), con estimaciones medias de 8.5 y 0.52 para número de alelos y heterocigosidad observada, respectivamente, como se esperaba.

El propósito de este estudio es determinar la variabilidad genética de corvina en los centros de investigación e instituciones universitarias en Europa, para describir el estado de los cuellos de botella identificados a través de la caracterización genética de los reproductores en cautiverio, como un primer paso para comenzar los programas de reproducción de corvina.

Se tomaron muestras de un total de 432 reproductores corvina en 13 centros de 7 países (Fig. 2), y se estudiaron con 18 marcadores de microsatélite (STRI y SRTS).

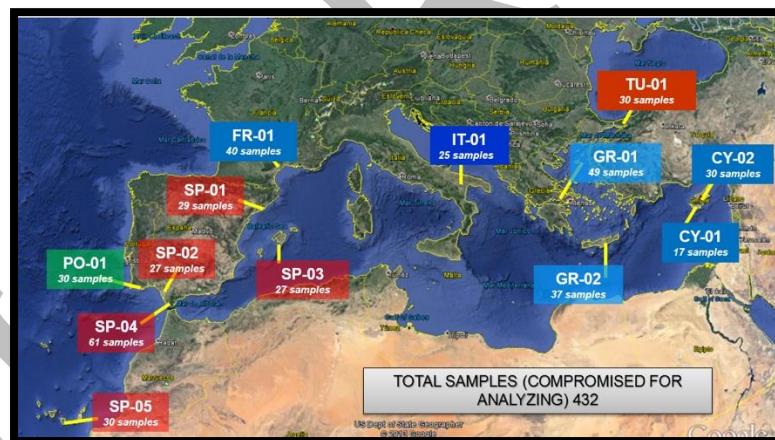


Figura 2. Distribución geográfica de la corvina estudiada en Europa, desde Canarias hasta Chipre.

Las medias aritméticas y ponderadas de los números de alelos fueron 3.7 y 4.13, respectivamente (Tabla 1). Se encontró una relación positiva entre el número de alelos y el tamaño de la población. Como heterocigosidad, tanto las estimaciones aritméticas como las ponderadas fueron similares (0,48) para la heterocigosidad observada, mientras que los valores fueron similares para la heterocigosidad esperada, 0,48 y 0,49, respectivamente. Las poblaciones europeas en cautividad de corvina fueron todas las poblaciones y observaron heterocigosidad que fueron más bajas que en las poblaciones silvestres (aproximadamente 3 veces y 18% más bajas, respectivamente). Estos números de alelos y heterocigosidad indicaron que la variación de la población es muy similar a la de las poblaciones silvestres o ha disminuido. Estas variables deben adaptarse a la población general, pero no deben usarse en combinación con ningún otro método. Las estimaciones de los tamaños efectivos (N_e) de cada población oscilaron entre 82 y 115, con una media de 87 (Tabla 2) y menos del mínimo recomendado para minimizar la depresión por



consanguinidad (50), pero inferior al mínimo considerado como requerido para mantener la capacidad de evolución (500).

Tabla 1. Promedios totales para copias de genes, alelos y heterocigosidades observadas y esperadas.

POPULATION	AVERAGES			
	Nº GENE COPIES	Nº ALLELES	HET.OBS.	HET.EXP.
PO-01	27.8	1.8	0.261	0.259
SP-01	54.4	5.2	0.585	0.598
SP-02	45.8	6.3	0.548	0.625
SP-03	51.6	4	0.561	0.505
SP-04	101.5	7.1	0.532	0.595
SP-05	56.3	2.8	0.519	0.446
FR-01	59.5	5.3	0.433	0.507
IT-01	46.3	3.4	0.547	0.502
GR-01-F1	26.88	2.5	0.453	0.449
GR-01-F2	54.7	3	0.388	0.402
GR-02-F1	34.5	3.4	0.473	0.506
GR-02-F2	28.1	2.4	0.493	0.44
TU-01	57.8	2.5	0.375	0.375
CY-01	24	3	0.495	0.509
CY-02	35.3	2.7	0.469	0.455
Arithmetic mean		3.69	0.48	0.48
Weighted mean		4.13	0.48	0.49

Tabla 2. Tamaño efectivo (Ne) y valores Theta (H) por población.

POPULATION	Theta (H)	Ne
PO-01	2,10178	115,48
SP-01	1,58012	86,82
SP-02	1,63525	89,85
SP-03	1,50028	82,43
SP-04	1,57611	86,60
SP-05	1,52339	83,70
FR-01	1,50044	82,44
IT-01	1,50005	82,42
GR-01-F1	1,52021	83,53
GR-01-F2	1,57866	86,74
GR-02-F1	1,50039	82,44
GR-02-F2	1,5292	84,02
TU-02	1,6321	89,68
CY-01	1,5007	82,46
CY-02	1,51591	83,29

Por lo tanto, es probable que las estimaciones de tamaños efectivos (NE) sean más grandes que el número de familias en la población. con nuevas familias y poblaciones para asegurar una base de población óptima para un programa de reproducción. El análisis de AMOVA reveló que el 18,19% de la variación se encontró entre las poblaciones estudiadas (Fst), mientras que el 81,82% restante se ubicó dentro de las poblaciones ($P < 0,0001$). Un Análisis de Correspondencia Factorial mostró dos grupos correlacionados con la distribución geográfica de las poblaciones (Atlántico y Mediterráneo), y un tercero para la población TU-01 de Turquía (Figura 3). El Fst significativo reportado es indicativo de un flujo genético bajo entre las poblaciones de corvina cautivas estudiadas, produciendo una fragmentación de las poblaciones y aumentando el efecto de los procesos genéticos estocásticos. Esta



alta variación entre la población y la fragmentación puede explicarse por las diferencias en los tres grupos o poblaciones identificadas y asociadas al área geográfica.

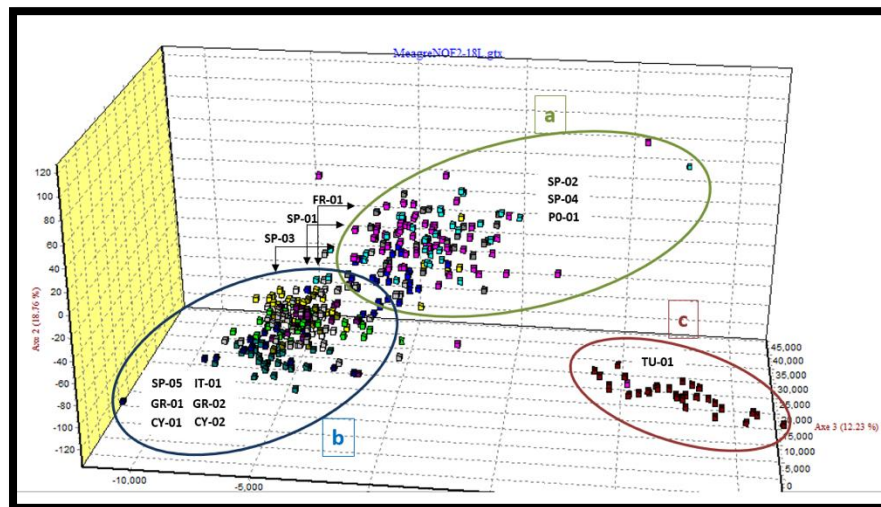


Figura 3. Análisis de correspondencia factorial de 18 loci y 376 peces (No. F2) distribuidos en 13 poblaciones mediterráneas de corvina.

Todos estos análisis indican que la variación es adecuada en los reproductores en cautividad. Sin embargo, algunos reproductores son cuestionables como poblaciones base y se requeriría un análisis más profundo para determinar la idoneidad de los reproductores para un programa de cría. Es muy claro que existe una variación genética más que adecuada en la población. Esta potencial diferenciación genética en genes y rasgos cuantitativos sería una herramienta importante para la constitución de un programa de selección genética en la Unión Europea, especialmente porque la corvina es una especie en clara desventaja en comparación con otras especies importantes dentro de la acuicultura europea.

Desarrollo de protocolos para cruces por parejas en desove espontáneo

(liderado por IRTA, Neil Duncan y HCMR, Constantinos Mylonas)

Cruzar por parejas es una forma de crear familias en programas de selección genética. Sin embargo, algunas especies marinas, como la dorada y la lubina europea, no se reproducen en parejas y el desove manual también es complicado. Por ejemplo, el éxito del desove de la dorada fue bajo cuando se realizó en parejas o grupos de hembras con un solo macho (Gorshkov et al., 1997). Varios autores han sugerido grupos grandes de dorada (Gorshkov et al., 1997, Duncan et al., 2013b) y Sparidae en general (Pankhurst, 1998, Mylonas et al., 2011). El desove en grandes grupos de criadores complica la creación de reproductores específicos que requieren tipos específicos de reproductores. Por lo tanto, una parte esencial del establecimiento de un programa de reproducción es establecer el control de la reproducción que permita la selección de parejas. Dado que esto se realiza a menudo de manera cautiva, casi siempre es inducido por tratamientos hormonales exógenos seguidos de desove, el objetivo de este estudio es examinar la posibilidad de desove en tanques y de manera fiable por pares y con rotación masculina.

1. Número máximo de desoves en respuesta a inyecciones semanales de GnRH α (P1. HCMR)

Parejas únicas de peces se transfirieron a tanques de 5,000 l bajo un fotoperíodo natural simulado, pero a una temperatura controlada de 19-20 ° C. Las hembras se consideraron elegibles para la inducción del desove si contenían ovocitos en vitelogénesis completa con un diámetro de > 550 μ m (Mylonas et al., 2013b). Los peces machos se consideraron elegibles para la inducción del desove, si liberaban



cantidades sustanciales de esperma (Mylonas et al., 2013b). Las inyecciones de GnRH se administraron una vez a la semana utilizando cuatro pares de peces para el tratamiento ($n = 4$). Las hembras (media \pm peso corporal SD 9.7 ± 1.0 kg) fueron tratadas con una inyección de GnRH α de $15 \mu\text{g kg}^{-1}$. Los machos (7.9 ± 1.0 kg de peso corporal) se trataron al comienzo del experimento con $43\text{-}57 \mu\text{g kg}^{-1}$ utilizando un implante de GnRH α de $450\text{-}500 \mu\text{g}$ para una dosis efectiva de $\sim 50 \mu\text{g kg}^{-1}$ GnRH α , con el fin de potenciar la espermiación. La implantación de GnRH α en machos se repitió en muestreos posteriores, si la producción de esperma se consideraba baja. Después del tratamiento con GnRH α , se colocaron en tanques conectados a recolectores de semilla y se les permitió engendrar. Cuando un total acumulativo de dos hembras (es decir, 50%) no engendró en respuesta a 2 inyecciones consecutivas, se concluyó el ensayo y no se administraron más inyecciones.

Los huevos se recolectaron en un cubo de 10 litros y su número (fecundidad) y la fertilización fueron evaluados por los autores en una muestra de 10 ml para determinar la presencia de embriones viables utilizando un estereoscopio. Los huevos de cada desove se colocaron individualmente en placas de microtitulación de 96 pocillos (en duplicados). Las placas de microtitulación se colocaron en un incubador de temperatura controlada y se mantuvieron durante 5 días a $19 \pm 0,5 \text{ }^\circ\text{C}$. El embrión produjo un desarrollo embrionario y larvario temprano 24 horas después de la recolección del huevo (~ 36 horas después del desove), larvas incubadas (examinadas ~ 60 horas después del desove) y larvas viables el día 5 después de la recolección del huevo (\sim Absorción saco de yema). A $18\text{-}20 \text{ }^\circ\text{C}$, la incubación de huevos se realiza en 44-56 h.

Los diámetros medios de ovocitos (\pm SEM) al inicio del estudio fueron de $590 \pm 10 \mu\text{m}$, y en todo el estudio oscilaron entre $550 \pm 9 \mu\text{m}$ y $620 \pm 6 \mu\text{m}$, con algunas variaciones pequeñas, pero estadísticamente significativas. Se pudieron observar grandes cantidades de ovocitos vitelogénicos en las biopsias de todas las hembras hasta la semana 5, de las hembras hasta la semana 16 y de las hembras hasta la semana 18, una semana después de la última inyección de GnRH α (Fig. 4). Una hembra no engendró en respuesta a las inyecciones de GnRH α en las semanas 6 y 7 y, por lo tanto, no fue utilizada nuevamente para el estudio. Otra hembra no engendró en respuesta a las inyecciones de GnRH α en las semanas 16 y 17, momento en el que se concluyó el experimento.

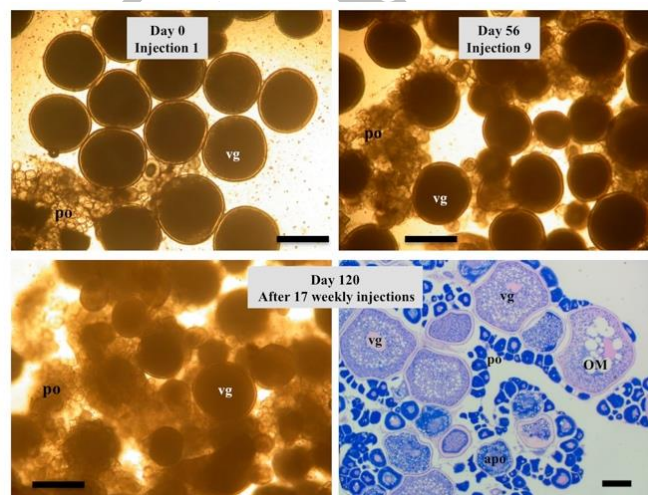


Figura 4. Montaje húmedo y cortes histológicos de biopsias ováricas de corvina inyectadas semanalmente con GnRH α . apo = apoptótico, Vg = vitelogénico, OM = maduración del ovocito, po = ovocito primario. La barra negra en los montajes húmedos y las secciones histológicas son 500 y 200 μm , respectivamente.

Las hembras inyectadas con GnRH α ovularon hasta 17 semanas consecutivas, la mayoría de las veces ovulando tanto en el segundo como en el tercer día después de cada inyección semanal (Fig. 5). Las primeras ovulaciones obtenidas 2 días después de cada inyección tuvieron una fecundidad



significativamente mayor en comparación con las segundas ovulaciones obtenidas 3 días después de cada inyección. En general, hubo una correlación negativa significativa entre los valores de fecundidad de la segunda ovulación y el número de inyección de GnRH α . El éxito de la fertilización fue alto durante el experimento (Fig. 5), sin ningún efecto significativo de la inyección de GnRH α o después de la inyección, y con la excepción de la segunda ovulación de la última inyección de GnRH α (54%) siempre fue > 80% y la mayoría de las veces > 90%.

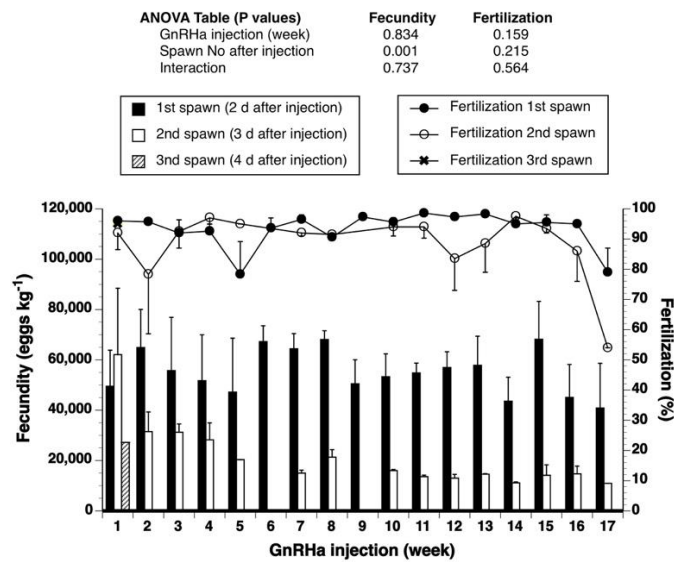


Figura 5. Media (\pm SEM) fecundidad diaria y fertilización de la corvina ($n = 1-4$) inducida para engendrar con inyecciones de GnRH α ($n = 17$, una vez por semana).

El desarrollo embrionario fue muy alto y no hubo diferencias significativas en el curso del estudio en respuesta a inyecciones consecutivas de GnRH α , en términos de supervivencia embrionaria durante 24 horas, eclosión o supervivencia larvaria en 5 días, incluso después de 17 inyecciones semanales de GnRH α .

En un trabajo publicado recientemente se ha demostrado que las inyecciones múltiples de GnRH inducen hasta 7 ciclos semanales de desove en corvina (Mylonas et al., 2015). El presente experimento corroboró y extendió los resultados, demostrando la posibilidad de producir grandes cantidades de huevos de alta calidad. No se conoce que estos resultados se hayan observado a una temperatura constante de $\sim 21^\circ\text{C}$ durante el ensayo, que se consideró óptimo para el desove en ensayos futuros (Mylonas et al., 2013a; Mylonas et al., 2013b). La corvina en la naturaleza tiene un desarrollo ovárico asincrónico (Gil et al., 2013) y dependiendo de la ubicación de la temporada de desove. Sin embargo, no está claro cuál es la cinética de desove natural de la corvina, cuál es el intervalo entre desoves y cuántas veces puede un pez desovar durante una sola temporada (Gil et al., 2013; González-Quirós et al., 2011). Como de costumbre, también es posible obtener información espontánea en cautiverio (Duncan et al., 2013). Sin embargo, el presente estudio demuestra que se mantiene de manera oportuna y que se mantiene en un momento dado (\pm SD) valores de fecundidad relativa de 1.42 ± 0.15 millones de huevos kg^{-1} de peso corporal por año.

2. Desoves por parejas con rotación semanal de machos, Experimento I (P1. HCMR).

Este experimento fue desarrollado para desarrollar un método para optimizar el número de familias producidas por un número de reproductores individuales dado. Se han transferido cuatro pares de peces (un macho y una hembra) a tanques de 5,000 l a fotoperiodo natural y temperatura constantes (19 y 20°C). Las inyecciones de GnRH α ($15 \mu\text{g kg}^{-1}$) se administraron una vez a la semana (todos los lunes) a



las hembras (denominadas Juliet, Cleopatra, Cecy y Helena) de peso corporal medio SD de 11.7 ± 2.6 kg, y los cuatro machos (nombrados Romeo, Cesar, Peri y París) de peso corporal medio \pm SD de 10.2 ± 1.2 kg de peso corporal. Cada semana, los machos fueron emparejados con una hembra y tratados con GnRH α , se colocaron en tanques de desove separados y se les permitió frezar durante una semana. Los huevos fueron recolectados y evaluados como se ha descrito en la sección anterior 1 para las mejores tasas de fecundidad y fertilización, y después para supervivencia de ellos embriones 24 h después de la recolección de los huevos, éxito de la eclosión y supervivencia larvaria en el día 5 posterior a la recolección de los huevos.

Después de la primera inyección de GnRH α , todas las hembras ovularon en tres días consecutivos (Fig. 6), similar a lo que se observó en el año anterior y se presentó anteriormente (Fig. 5). De manera similar, después de la segunda inyección de GnRH α , todas las hembras volvieron a ovular durante dos días consecutivos. Sin embargo, a partir de la tercera inyección de GnRH α , aparecieron variaciones significativas entre las hembras. Algunas ovularon solo una vez en este momento, mientras que después de la cuarta inyección solo dos peces continuaron ovulando. Estos resultados son diferentes del año anterior (Fig. 5), pero también de otros trabajos publicados de nuestro laboratorio (Mylonas et al., 2015). El examen de los ovarios de las hembras que no respondieron a la cuarta inyección ("Helena" y "Cecy") indicó que las hembras no contenían más ovocitos vitelogénicos de los que podían inducirse para madurar y desovar.

Entonces, al parecer, estas dos hembras habían madurado y ovulado todos los ovocitos vitelogénicos en respuesta a las tres primeras inyecciones de GnRH α , y no reclutaron más ovocitos, como fue el caso con las otras dos hembras ("Cleopatra" y "Julieta"). y experiencias anteriores (Fig. 6) y trabajos publicados (Mylonas et al., 2015). La única diferencia entre este experimento y el anterior es que tanto los machos como las hembras pudieron asumir que esta interrupción en el comportamiento reproductivo de los peces podría verse afectada por algunas de las hembras. Es interesante notar, sin embargo, que el efecto general de las hembras no fue significativamente diferente (Figura 7), lo que sugiere que las hembras tienen más probabilidades de producir huevos por lote.

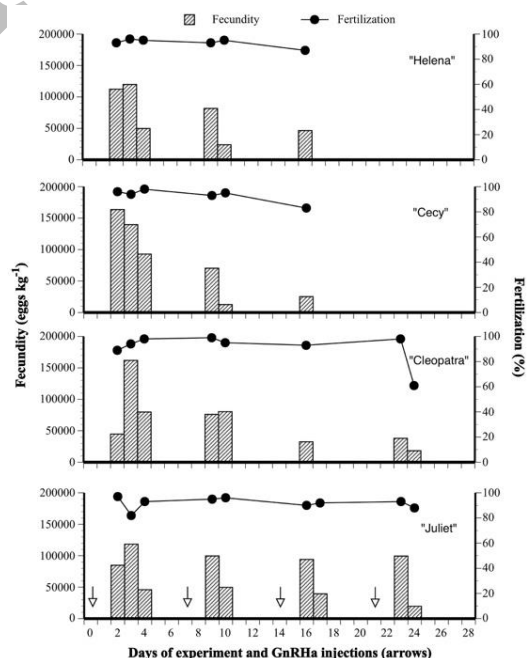


Figura 6. El éxito de la fecundidad y fertilización de los lotes de puestas de hembras de corvina individuales ($n = 4$) indujeron ovulaciones con múltiples inyecciones de GnRH α ($n = 4$, semanalmente) durante 2015 y emparejadas con 4 machos (llamados Romeo, Cesar, Peri y París). En cada inyección de GnRH α , los machos fueron movidos a un tanque diferente, emparejándose con una hembra diferente. El primer tratamiento con GnRH α se realizó el 4 de mayo de 2015.

Aparte de las diferencias significativas en la respuesta a la inyección de GnRH α y el número total de reproducciones entre las hembras, no hubo diferencias significativas en la calidad de los huevos



producidos (Fig. 7). Estos resultados sugieren que la corvina hembra puede producir huevos de buena calidad con diferentes machos y en respuesta a los cambios semanales de "parejas", sin ningún impacto negativo significativo.

De manera similar, no hubo diferencias significativas en la calidad de los huevos obtenidos cuando las hembras se emparejaron con un macho específico (Fig. 8), lo que demuestra una vez más que todos los machos tenían el mismo potencial de frezar con éxito y producir huevos de buena calidad. Se ha demostrado en experimentos de fertilización *in vitro* en otras especies, que existen algunas incompatibilidades entre machos y hembras cuando se trata de la fertilización, lo que resulta en una menor fertilidad cuando se cruzan machos específicos con hembras específicas (Saillant et al., 2001). Sin embargo, en el presente experimento solo se ha utilizado un pequeño número de individuos, por lo que todavía existe la posibilidad de que existan incompatibilidades de fertilización entre machos y hembras entre algunos individuos de esta especie.

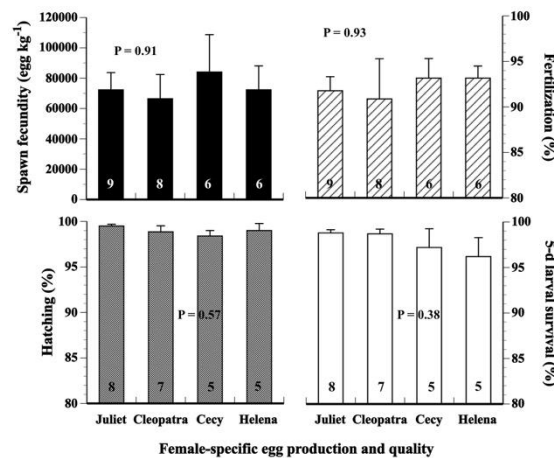


Figura 7. Media (\pm SEM) fecundidad relativa diaria, éxito de fertilización, eclosión y supervivencia larvaria de hembras de corvina individuales ($n = 4$) después de cada inyección de GnRHa ($n = 4$, una vez por semana) (vea la Fig. 1.5 para los desoves individuales). Los números en las barras indican el número de ovulaciones individuales.

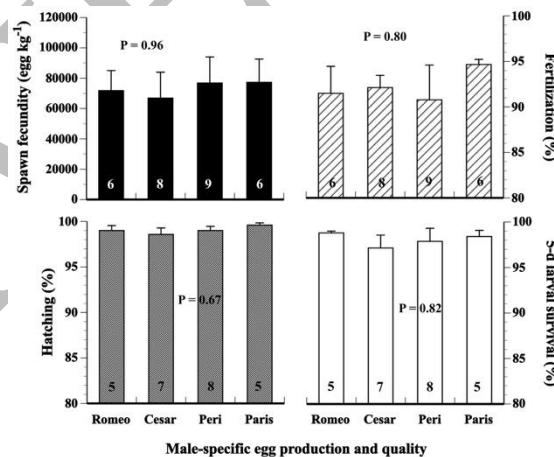


Figura 8. Media (\pm SEM) fecundidad relativa diaria, éxito de la fecundación, eclosión y supervivencia larvaria de huevos en presencia de diferentes machos de corvina ($n = 4$) después de cada inyección GnRHa ($n = 4$, una vez por semana) (ver Fig. 1.5 para desoves individuales). Los números en las barras indican el número de ovulaciones individuales.

Como se esperaba, según el trabajo publicado anterior (Mylonas et al., 2015), pero no de acuerdo con los experimentos realizados anteriormente (Fig. 5) Hubo una reducción significativa en el éxito de las inyecciones de GnRHa, mientras que no hubo diferencia en el éxito de la fertilización (fig. 9) y posterior



desarrollo del huevo. Como resultado, este resultado se considera deseable, ya que no se puede esperar que mantenga una tasa de producción estable en el transcurso de la temporada reproductiva. También se han reportado resultados similares para la lubina europea, donde la fecundidad del huevo disminuyó en aproximadamente un 50% después de la inducción del desove posterior con inyecciones de GnRH α (Mylonas et al., 2003).

Sin embargo, desde el punto de vista de los objetivos del presente experimento, creemos que la producción de un número adecuado de huevos puede considerarse exitosa. Se produjeron un total de 14 familias (medio sib), de un máximo de 16 (4 machos x 4 hembras), cada una con al menos 200,000 huevos de > 80% de éxito de fertilización. Por lo tanto, este método de emparejar un macho y una hembra con una rotación de los sexos puede ser utilizado por criadores comerciales para producir múltiples familias y un programa de cría que puede mantener la variabilidad genética. Obviamente, en una situación comercial, es probable que sea una "prueba de concepto" exitosa para este enfoque.

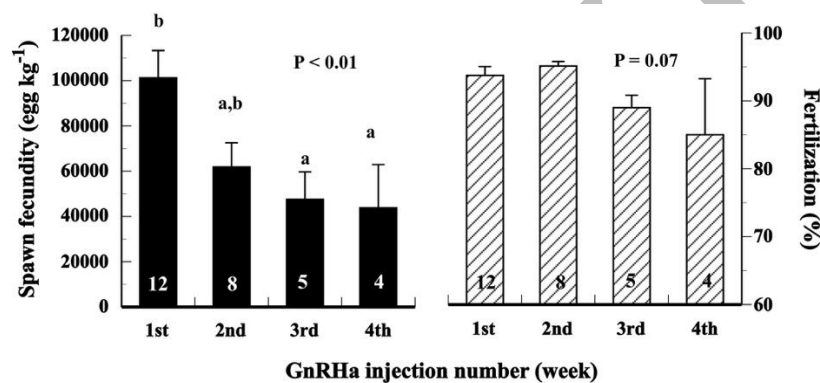


Figura 9. Media (\pm SEM) fecundación relativa diaria y éxito de la fertilización, de pares de corvina ($n = 4$) después de cada inyección de GnRH α ($n = 4$, una vez por semana) durante 2015 (ver Fig. 1.5 para desoves individuales). Los números en las barras indican el número de desoves individuales. Diferentes superíndices de letras indican diferencias significativas entre los medios.

En conjunto, estos experimentos han demostrado que es posible producir el desove de la corvina para la producción de múltiples familias de padres con fenotipos conocidos. La producción de familias deseadas forma la base de un programa de mejora genética (Duncan et al., 2013b) y esto ha sido un cuello de botella en la puesta a punto de programas reproductivos en algunas especies como dorada (Gorshkov et al., 1997) y lubina europea. El hecho de que desoves por parejas en corvina es posible confirma indicios previos de desoves grupales, de que los desoves por parejas podrían ser un fenómeno natural. Por ejemplo, Duncan et al., (2012), demostraron con el uso asignación de paternidades mediante microsatélites, que un número de desoves de grupos de seis reproductores era de una sola pareja, indicando que al menos cuando dispuestos en pequeños grupos una pareja había desovado junta. Además, Mylonas et al. (2015), establecieron parejas de reproductores e indujeron las parejas a desovar cada semana por un total de 7 semanas.

Los estudios actuales, han avanzado estos estudios dos veces. En primer lugar, desoves por parejas se ha logrado repetidamente por hasta 17 semanas sin cambios en la estructura de las parejas. En segundo lugar, los peces machos se intercambiaron antes de cada inducción del desove para producir una familia diferente de hermanos o medio hermanos con cada desove inducido. La eficacia de los pares de reproducción fue alta 76% (Experimento 1, 14 pares generados de 16 (87%), experimento II, 22 pares



de 37 (59%), experimento III, 25 pares de 27 (93%) y en todo el se realizaron tres experimentos con un total de 61 familias (total y medio sib) que tuvieron más de 200,000 huevos con un 80% de éxito de fertilización. La obtención de un gran número de familias con cantidades adecuadas de huevos es un requisito previo para un programa de reproducción.

Descripción de las características del esperma y métodos de criopreservación

(liderado por IFREMER, Christian Fauvel e IRTA, Neil Duncan)

La calidad de los espermatozoides se puede describir objetivamente a través de diferentes características accesibles mediante observaciones de campo, como la concentración, la motilidad y la fertilidad, que se han descrito ampliamente para la acuicultura (Cabrita et al., 2009, Bobe y Labbé, 2010, Fauvel et al., 1999, Fauvel et al., 2010). Los espermatozoides de los peces están inmóviles en el tracto genital y son causados por el cambio en la presión osmótica causada por el contacto con el medio externo en el momento de la eyaculación (Cosson et al., 2008). Si la dilución de los espermatozoides es adecuada, esta activación es global para activar todos los espermatozoides (Billard y Cosson, 1992), de modo que la motilidad máxima (% de espermatozoides móviles) generalmente se observa en los primeros segundos. Debido a una compensación entre la respiración débil y el alto costo energético del movimiento, la motilidad y la velocidad del esperma disminuyen rápidamente (Christen et al., 1987). La evaluación de la concentración, la motilidad inicial, la velocidad del esperma y la duración del movimiento progresivo son índices interesantes de la calidad del esperma (Kime, 2001, Rurangwa et al., 2004).

En cautiverio, la reproducción de peces puede verse afectada por factores externos o internos no controlados que modifican el control neuroendocrino de los procesos reproductivos a diferentes niveles. Estas interrupciones endocrinas se han superado con éxito mediante la aplicación de hormonas homólogas o heterólogas (Zohar y Mylonas, 2001, Mylonas et al., 2016a). En el caso de la espermiación, lubina europea (Fauvel et al., 1999). En el caso de corvina, un tratamiento con análogos de LHRH indujo a los machos a recuperar la producción de esperma después de un corto lapso de tiempo (Mylonas et al., 2016b), pero sigue siendo interesante evaluar la calidad de este esperma recién producido a través de los protocolos estandarizados. en el proyecto DIVERSIFY.

El análisis de los espermatozoides solo revela la calidad intrínseca del gameto como consecuencia del aporte fisiológico paterno (espermatogénesis, espermiogénesis y espermiación) y también de la fisiología adecuada de los espermatozoides, como los procesos de envejecimiento, que afectan progresivamente al esperma junto con la estación reproductiva (Dreanno et al. ., 1999). Después de la recolección de espermatozoides disminuye de una manera específica de la especie. Por ejemplo, los espermatozoides de trucha arcoiris sin diluir presentaron una alta motilidad después de 34 días (Stoss y Holt, 1983), mientras que se reportó una alta variabilidad después de algunas horas en lubina (Fauvel et al., 2012). En la fertilización artificial, la colección de gametos masculinos y femeninos puede no ser concomitante. En ese caso, según la especie, los espermatozoides deben estar acondicionados para almacenamiento en frío o almacenamiento criogénico. Fue interesante probar la capacidad de criopreservación utilizando medios optimizados. Leibovitz L15 protegió eficazmente el esperma de la lubina *Dicentrarchus labrax* (Fauvel et al., 2012), el cherne *Polyprion americanus* y la seriola *Seriola dumerili*, y se propuso estudiar su efecto protector sobre la esperma de la corvina.

Para la recolección de espermatozoides de machos que estaban en plena espermiación, el poro genital se limpió y secó cuidadosamente y se aplicó una presión suave a la prueba para obtener esperma. Se evitó la orina para evitar la contaminación. El esperma se recolectó directamente en jeringas de 2 ml inmediatamente antes de la primera extracción de hembras. Las muestras de esperma se mantuvieron en hielo. Milt se diluyó 1: 4 (v: v) en medio de cultivo celular Leibovitz modificado; Se añadieron glutamina (0,3 mg / ml de Leibovitz diluido), piruvato de sodio (6 mg / ml) y NaOH al primer medio diluido de Leibovitz (350 mOsm y pH 7,3) para obtener un medio Leibovitz de pH 8 y 450 mOsm. Para prevenir la motilidad inicial de los espermatozoides, la osmolaridad se redujo a 250 mM por dilución en agua destilada. Se añadió sulfato de gentamicina (1 µL / mL) para prevenir el desarrollo bacteriano y la



albúmina sérica (BSA) (0.066 mL 30% BSA / mL dilución), para proteger la membrana plasmática y prevenir la agregación de espermatozoides. Para el muestreo de espermatozoides, se utilizaron pipetas de desplazamiento positivo.

Los resultados demostraron que la inducción hormonal de los machos (duración de la motilidad inicial y VAP a lo largo del tiempo) y otros no (densidad, duración, motilidad inicial y VAP inicial). No se observaron diferencias significativas entre el espermatozoides y el espermatozoides obtenido antes de la inyección de GnRH_a y después de esto y la duración, la motilidad inicial o la VAP inicial (Tabla 3). Sin embargo, se obtuvieron valores más altos en la motilidad inicial después de la inyección de GnRH_a. El porcentaje de motilidad disminuyó después de la activación, mostrando aproximadamente el 50% de la motilidad hasta después de la inyección en la inyección de GnRH_a. Sin embargo, en muestras obtenidas después de la inyección de GnRH_a, todavía se exhibió ~ 50% de la motilidad después de 75 s desde la activación. Después de 75 años, se observó una disminución drástica en la motilidad. El VAP exhibió el mismo patrón; Valores iniciales después de la inyección de GnRH_a (45 s) que antes (35 s) (Fig. 10).

Tabla 3. Parámetros de calidad del espermatozoides de las muestras de espermatozoides obtenidas antes y después de la inyección de GnRH_a. Se disponía de datos de 5 machos durante el período. Los valores se expresan como media ± desviación estándar. Letras diferentes significan diferencias significativas entre antes y después del tratamiento hormonal.

Before/ after GnRH _a injection	Sperm concentration (spermatozoides/mL)	Sperm duration (min)	Initial motility (%)	Initial VAP (µm/s)
Before	$3.21 \cdot 10^{10} \pm 1.18^a$	1.71 ± 0.29^a	48.17 ± 2.80^a	90.69 ± 5.76^a
After	$2.76 \cdot 10^{10} \pm 0.62^a$	1.57 ± 0.50^a	66.76 ± 15.83^a	98.07 ± 11.68^a

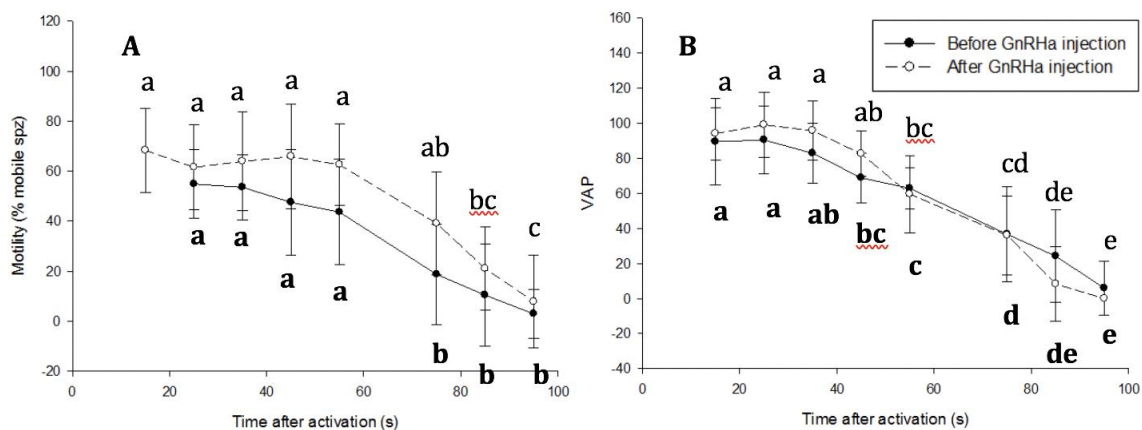


Figura 10. Efecto del tratamiento con GnRH_a en (A) el porcentaje de espermatozoides móviles (%) y (B) Velocidad de trayectoria promedio de los espermatozoides (µm / s) durante el período de tratamiento. Los datos se expresan como media ± desviación estándar. Las diferentes letras en negrita en minúscula significan diferencias significativas con el tiempo después de la activación antes de la inyección de GnRH_a. Diferentes letras minúsculas significan diferencias significativas con el tiempo después de la activación después de la inyección de GnRH_a. Se obtuvieron datos masculinos (n = 15).

Efecto de almacenamiento y criopreservación sobre los parámetros de Calidad del espermatozoides

El sistema muy simple utilizado para congelar el espermatozoides consistió en situar las pajuelas a una distancia de 6 cm de la superficie, que es una altura donde los vapores enfrían el espermatozoides de acuerdo con una pendiente ascendente. El uso de una espuma de poliestireno de 6 cm de alto se enfría hasta -100 ° C después de 10 min. Después de 10 minutos, la temperatura se redujo a -196 ° C sumergiendo las pajuelas en LN (Fig. 11). En cuanto al análisis de espermatozoides, Tabla 4, no hubo diferencias significativas



entre la duración de la motilidad ni los valores de VAP iniciales del espermatozoide a diferentes tipos de almacenamiento, pero la motilidad inicial del espermatozoide almacenado en Leibovitz durante 24 horas fue significativamente el más bajo.

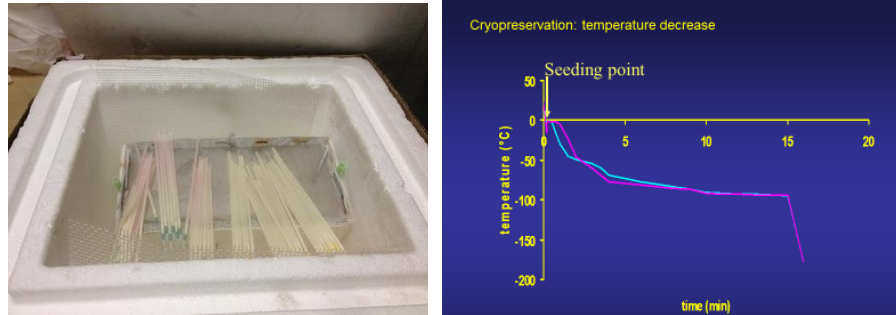


Figura 11. Dispositivo de crioconservación con pajuelas en el dispositivo flotante en vapores de nitrógeno líquido (izquierda) y temperatura del termopar introducida en una pajuela llena, es decir, en contacto con el espermatozoide (derecha). Se puede observar un aumento de la temperatura en el momento de la cristalización de la fase líquida, que es una reacción exotérmica. Este aumento se llama punto de siembra. La curva verde corresponde a la congelación de la pajuela y la púrpura se obtuvo colocando 1,8 ml de criotubos (Nalgene) a 2 cm sobre LN.

Tabla 4. Calidad semanal del espermatozoide de las muestras utilizadas en el experimento 3 (comparación de la fertilización con espermatozoide fresco, crioconservado y espermatozoide almacenado en Leibovitz durante 24 h). Los datos de 5 machos se utilizaron como media \pm desviación estándar. Diferentes letras minúsculas significan diferencias diferentes entre diferentes variables de diferentes tipos de almacenamiento en la misma semana. Diferentes letras mayúsculas significan diferencias significativas entre cada parámetro de espermatozoide fresco utilizado en la fertilización entre tres semanas (leer en columnas).

Experiment	Sperm storage	Total duration (s)	Initial motility (%)	Initial VAP ($\mu\text{m/s}$)
3a	Fresh for storage	1.66 \pm 0.59 ^a	55.16 \pm 13.81 ^a	109.37 \pm 15.00 ^a
	Cryopreserved	1.29 \pm 0.32 ^a	50.24 \pm 15.90 ^a	93.73 \pm 15.59 ^{ab}
	Chilled Stored for 24 h	2.07 \pm 0.51 ^a	8.91 \pm 6.79 ^b	68.00 \pm 3.73 ^b
	Fresh for fertilisation	1.82 \pm 0.29^{aA}	80.51 \pm 13.05^{cB}	81.29 \pm 12.72^{bA}
3b	Fresh for storage	1.77 \pm 0.04 ^a	42.66 \pm 3.78 ^a	72.28 \pm 11.18 ^{ab}
	Cryopreserved	1.07 \pm 0.31 ^b	24.16 \pm 18.32 ^{ab}	50.26 \pm 8.09 ^a
	Chilled Stored for 24 h	0.61 \pm 0.04 ^c	2.60 \pm 1.00 ^b	55.72 \pm 5.1 ^a
	Fresh for fertilisation	1.34 \pm 0.08^{bB}	48.80 \pm 8.08^{aA}	83.65 \pm 5.38^{bA}
3c	Fresh for fertilisation	0.60 \pm 0.09^c	70.29 \pm 7.30^{AB}	260.15 \pm 7.77^B

2

Los valores de espermatozoide de corvina se informan en este estudio ($1.89 - 3.15 \cdot 10^{10}$ spzoa / mL) (Mylonas et al., 2013) y a otros peces marinos. El porcentaje de motilidad inicial también fue similar a los reportados para corvina (53 - 74%) (Schiafone et al., 2012) (44-80%) (Mylonas et al., 2013). Los espermatozoides no mostraron una mayor pendiente de decaimiento de la motilidad y el porcentaje de espermatozoides móviles seguido de un declive gradual y mostró \sim 50% de motilidad hasta 55 s después de la activación. La medición inicial de espermatozoides de corvina en el presente estudio fue similar a los medidos en otros estudios de espermatozoides de corvina (17-24 $\mu\text{m/s}$) (Schiafone et al., 2012). Sin embargo, los estudios actuales son similares a otros peces marinos, como la lubina (150 $\mu\text{m/s}$) (Fauvel et al., 2012) y la anguila europea (118 $\mu\text{m/s}$) (Pérez et al., 2016). Estos valores están relacionados con espermatozoides rápidos ($> 100 \mu\text{m/s}$) (Gallego et al., 2013), el objetivo inicial VAP tuvo una disminución rápida, de modo que los valores iniciales de VAP se mantuvieron solo después de la activación de 35 s. La motilidad de los espermatozoides es un aspecto importante de la fertilización y puede compararse con las tasas de fertilización. De hecho, los coeficientes de correlación más altos se



encontraron para VAP (Gallego et al., 2013). Por lo tanto, si la VAP está altamente correlacionada con la capacidad de fertilización, el período de fertilidad de los espermatozoides podría reducirse a 35 s. Las características del espermatozoides de corvina resaltadas en el caso de contacto entre óvulos y espermatozoides, tan pronto como sea posible, y la fertilización *in vitro*. Este estudio mostró que la inducción artificial de la espermiación puede afectar la capacidad de respuesta en peces machos e hicieron una variación en los parámetros de calidad (Rurangwa et al., 2004) como se observó en la duración inicial de los valores de movilidad y VAP. Estos valores fueron más largos después de la inyección de GnRHa que antes de la inyección, lo que demuestra que el tratamiento hormonal indujo una motilidad inicial más alta y probablemente el éxito de la fertilización. Por lo tanto, la aplicación de GnRHa fue un método confiable que se debe utilizar junto con la motilidad y velocidad del espermatozoides y la recolección de espermatozoides, especialmente hacia el final de la temporada de desove.

El último factor que podría facilitar la producción de espermatozoides en grandes volúmenes, sin perder calidad y fertilidad es la capacidad de conservar espermatozoides en grandes volúmenes sin perder calidad ni fertilidad. La capacidad de fertilización de los espermatozoides de los peces puede mantenerse durante diferentes intervalos de tiempo después de la recolección si las condiciones de conservación son adecuadas. Para la conservación a largo plazo, la crioconservación es la mejor solución. La crioconservación provoca la deshidratación celular y concentra el citosol para reducir la cristalización del hielo durante el contacto con nitrógeno líquido. La mayor parte del daño celular ocurre durante la congelación y el descongelamiento y puede deberse a un resumen de factores, como la disminución de la producción de ATP, la despolarización de la membrana mitocondrial, el estrés osmótico y la formación de hielo intracelular. Por lo tanto, los crioprotectores son necesarios para proteger la piel del frío y el choque térmico, pero el mismo crioprotector puede ser letal para las células descongeladas. Para uso a corto plazo o antes de la crioconservación, el espermatozoides se puede almacenar por varias duraciones con el uso de un extensor. Un extensor es un medio similar a la composición del fluido seminal utilizado para diluir el espermatozoides que evita cualquier motilidad. Por lo tanto, la elección apropiada del extensor, el crioprotector para la crioconservación y las condiciones de descongelación, son algunos de los aspectos más importantes para establecer protocolos de almacenamiento (Cabrita et al., 2005, Muchlisin, 2005, Fauvel et al. 2012, Gallego, 2012). Hasta ahora, no hay informes sobre la fertilidad de los espermatozoides de corvina almacenados, tanto crioconservados como diluidos, o sobre el desarrollo de estos protocolos. La idoneidad de los extensores y crioprotectores difiere de un pez a otro (Gallego, 2012). En el presente trabajo, hemos utilizado el protocolo propuesto por Fauvel et al. (2012): El uso de un medio adaptado de Leibovitz como diluyente en una dilución 1: 4 (espermatozoides: diluyente) y DMSO al 10% como crioprotector.

Como conclusión, el análisis estandarizado de la calidad del espermatozoides utilizando el código abierto ImageJ CASA proporcionó un conjunto de datos completo para la caracterización del espermatozoides de corvina que se usó para estimar la calidad durante la temporada reproductiva y para implementar protocolos para el almacenamiento de espermatozoides refrigerado o crioconservado. Revela que fue posible recolectar espermatozoides de buena calidad durante un período de 2 meses y almacenarlo para la fertilización artificial. El medio Leibovitz modificado está bien adaptado para la conservación del espermatozoides de corvina. Sin embargo, debe tenerse en cuenta que el uso de este medio para el almacenamiento de espermatozoides enfriado debe ser refinado para evitar discrepancias de resultados descontrolados. Finalmente, las características actuales de los espermatozoides están de acuerdo con el éxito de fertilización obtenido de los diferentes experimentos desarrollados en el proyecto DIVERSIFY (configuración de la fertilización artificial de corvina).

Desarrollo de métodos de fertilización *in vitro* para cruces planificados.

(liderado por IRTA, Neil Duncan e IFREMER, Christian Fauvel)

El desarrollo del desove de la franja con métodos de fertilización *in vitro* es necesario para la industria de la acuicultura de corvina (*Argyrosomus regius*), a fin de facilitar los cruces planificados entre los criadores seleccionados para ayudar en la implementación de los programas de mejoramiento genético. Las hembras con etapas avanzadas de madurez fueron inducidas a ovular con una sola inyección de 15



$\mu\text{g} / \text{kg}$ de GnRH α . Las inyecciones se aplicaron a las 20: 00-22: 00 horas y las hembras se mantuvieron separadas de los machos en la oscuridad hasta que se verificaron las ovulaciones. Los controles para la ovulación se realizaron cada 2.5 horas desde 35 a 45 horas después de la inyección de GnRH α . Cuando se obtuvieron huevos ovulados, se realizó la fertilización in vitro y se evaluó la calidad del huevo determinando el porcentaje de huevos en desarrollo (Fig. 12). También se aplicó una inyección de GnRH α a los machos y se evaluaron los requisitos y la calidad del esperma. Se probaron las proporciones de esperma a huevos de aproximadamente 3,000 a 500,000 espermatozoides por huevo. Se observaron huevos ovulados a partir de las 35 horas. La calidad óptima de los huevos se observó a las 38-39 horas después de la inyección de GnRH α . De 35 horas a 38-39 horas, hubo un ligero aumento en la calidad de los huevos y la facilidad con la que se podían quitar los huevos, lo que indica que entre las 35 y 38 horas era posible que los huevos no estuvieran completamente ovulados. Después de 38-39 horas, hubo una disminución en la calidad de los huevos a 43-44 horas. La calidad del esperma se mantuvo sin disminución durante hasta 7 horas en el medio Leibovitz y la calidad del esperma no pareció afectar el éxito de la fertilización. La fertilización in vitro se realizó mezclando rápidamente huevos, esperma y agua de mar al mismo tiempo para garantizar que los espermatozoides se activaran y estuvieran en contacto con los huevos durante los primeros 30 segundos después de la activación, que se identificó como el período óptimo para la fertilización anterior. La proporción óptima de esperma a huevos para obtener un alto porcentaje de fertilización fue superior a 200,000 espermatozoides por huevo. El protocolo se utilizó con éxito en un gran cruce factorial de 120 fertilizaciones in vitro utilizando esperma fresco o criopreservado.



Figura 12. Diferentes fases de experimentos de fertilización artificial en P3. IRTA (España): arriba a la izquierda) recolección de esperma; Arriba a la derecha) colección de huevos; Abajo a la izquierda) Abajo a la mitad) vista de 134 lotes individuales de huevos fertilizados resultantes de un cruce factorial con 3 hembras, 4 machos y 3 tipos diferentes de almacenamiento de esperma (fresco, refrigerado almacenado y congelado) por triplicado; Abajo a la derecha) dispositivos para la evaluación del desarrollo embrionario después de la fertilización artificial.

Se indujo a un total de 14 hembras a ovular con algunas hembras inducidas en más de una ocasión para obtener un total de 24 aplicaciones diferentes de GnRH α para inducir la ovulación. Un total de 9 peces administrados la inyección de GnRH α no ovularon en el período de 35-45 horas. Estas incluyeron 4 hembras que nunca respondieron a la inyección de GnRH α y 5 hembras que no respondieron a la segunda aplicación de GnRH α . Un total de 15 inyecciones de GnRH α indujeron ovulación completa o parcial. Once ovulaciones de seis hembras diferentes han sido superadas por la ovulación (efecto de sobremaduración). La ovulación se detectó a las 35-39 h (2.100 - 2.340 min) después de la inyección dependiendo de la hembra. Sin embargo, hubo una alta variabilidad en la tasa de fertilización ($32.5 \pm$



43.50%) mientras que de 38 a 39 horas ($51.11 \pm 28.04\%$) esta variabilidad se redujo (Fig. 13). Esta variabilidad fue aún menor ($27.49 \pm 16.39\%$) y de 43 a 44 horas ($5.72 \pm 3.90\%$) después de la inyección de GnRH α . La variabilidad durante el período (bimodal) con huevos muy pobres (<20% de fertilización) y huevos buenos (> 60% de fertilización). Los huevos pobres (<20% de fertilización) parecían estar en proceso de ser ovulados. En todos los casos, en revisiones subsiguientes para la ovulación, se mejoró la calidad del huevo, lo que indica un período en el que la calidad del huevo se mejora al máximo. Si esta variabilidad inicial se elimina como un valor inicial, la regresión de Hill puede describir la distribución de los promedios de la tasa de fertilización. con $R^2 = 0.8167$. La regresión de Hill identificó una disminución lineal después de 40 horas entre la inyección y la extracción en las tasas de fertilización de los huevos de todas las hembras.

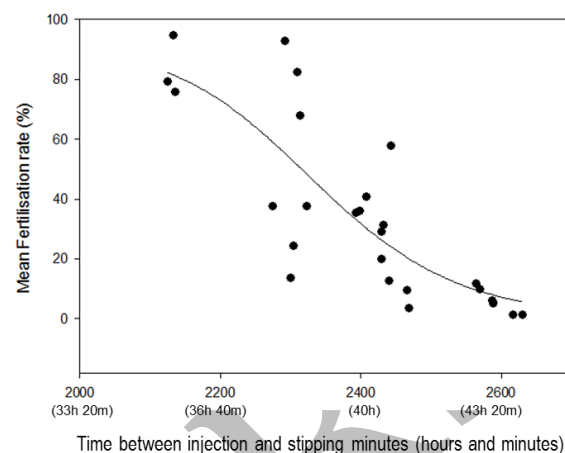


Figura 13. La tasa de fertilización de cada corvina hembra (*Argyrosomus regius*) en diferentes momentos después de la inyección de GnRH α (15 μg / kg). La línea representa una colina de regresión ($R^2 = 0.8167$). Los datos representan la disminución de las tasas de fertilización máxima de 10 ovulaciones de 5 hembras diferentes, es decir, el período de maduración excesiva.

Los huevos mantenidos a temperatura ambiente (aproximadamente 20°C) mantuvieron la viabilidad hasta 2 horas (Fig. 14). Hubo un pequeño descenso inicial en la tasa de fertilización durante los primeros 30-60 minutos, la fertilización se estabilizó en aproximadamente el 80% hasta 120 minutos después, cuando se observó un rápido descenso en la fertilización de los huevos. Se observaron divisiones asíncronas en muchos de los huevos fertilizados a las 4 h.

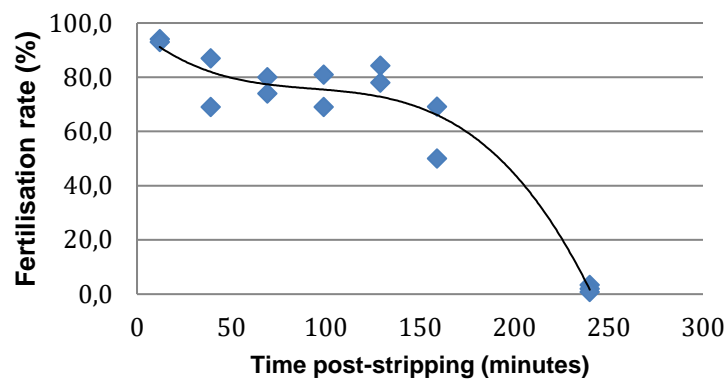


Figura 14. La tasa de fertilización (%) de los huevos de corvina (*Argyrosomus regius*) pelados mantenidos a temperatura ambiente durante diferentes momentos después de la extracción. La línea representa una regresión polinomial con una ecuación expresada: $y = -2E-05x^3 + 0,0058x^2 - 0,5891x + 97,447$ ($R^2 = 0,9523$).

Los resultados obtenidos en el presente estudio han establecido un protocolo para la fertilización artificial óptima de corvina en el estado actual de conocimiento. Los reproductores se deben examinar a las 38 h después de la inyección a 18°C para obtener una calidad óptima del huevo. Para la producción convencional, se recomienda un mínimo de 200,000 espermatozoides por huevo para asegurar altas tasas de fertilización. Además, se recomienda mezclar los huevos, el esperma y el agua para coordinar la activación con el contacto de los espermatozoides con los huevos, y los huevos de corvina deben ser fertilizados dentro de los primeros 50 minutos posteriores a la extracción, al menos para mantener una alta capacidad para ser fertilizado hasta que se haga más investigación para identificar qué retraso en la activación se puede asumir que no afecta el éxito de la fertilización o hasta que se desarrollen los extensores que imitan el fluido ovárico. La escalada ascendente a un gran cruce factorial de 120 fecundaciones artificiales utilizando espermatozoides frescos o crioconservados confirmó la viabilidad del protocolo.



2. Nutrición

Avances en nutrición de larvas y juveniles

(liderado por FCPCT, Daniel Montero, Marisol Izquierdo; Fontanillas, Ramón, Rosenlund, G. (SARC))

El objetivo general planificado dentro de esta sección es definir mejor las necesidades nutricionales de la corvina durante las fases de crecimiento previo y crecimiento para mejorar la consistencia del crecimiento y la salud y el bienestar de los peces. Para alcanzar este objetivo, se planificaron dos tareas diferentes: 1) la mejora de los alimentos para el destete de larvas y 2) la determinación de los requisitos nutricionales para promover la utilización, el crecimiento y el bienestar de los alimentos.

2.1. La mejora de las dietas de destete larvales:

A pesar del hecho de que el desarrollo larvario de corvina (*Argyrosomus regius*) y las técnicas de cría de larvas se han estudiado ampliamente, el destete a dietas secas sigue siendo un cuello de botella importante para esta especie. Así, en un primer paso, el objetivo fue definir mejor las necesidades nutricionales de la corvina para mejorar los actuales alimentos de destete de larvas para esta especie. Para mejorar las dietas de destete para la corvina, se realizaron diferentes ensayos para determinar los niveles óptimos tanto de ácidos grasos esenciales como de micronutrientes, que se sabe que son determinantes del rendimiento de los peces en estadios larvales en otras especies (Izquierdo y Koven, 2011; Hamre et al. al., 2013).

2.1.1. Ácidos grasos esenciales óptimos y niveles de micronutrientes relacionados en las dietas de destete para la corvina

Para determinar el efecto de las dietas de destete en el rendimiento larvario, se obtuvieron larvas de corvina de reproductores de desove inducidos de las instalaciones de GIA (Grupo de Investigación en Acuicultura) en la Universidad de Las Palmas de Gran Canaria (ULPG) (Islas Canarias, España) donde experimento se llevó a cabo. Se realizó un ensayo para probar seis microdiets por triplicado. Las larvas se alimentaron previamente con rotíferos enriquecidos (proteína DHA Selco; INVE, Dendermonde, Bélgica) hasta 14 días después de la eclosión (dah). Las larvas de Corvina (longitud total inicial 4.07 ± 0.26 mm, media \pm desviación estándar; peso corporal seco 0.06 ± 0.01 mg) se distribuyeron al azar en 18 tanques experimentales con una densidad de 2500 larvas por tanque y se alimentaron con una de las dietas experimentales probadas por triplicado. 14 días, a una temperatura promedio del agua de 23.2 ± 0.20 ° C. Todos los tanques (200 L) se suministraron con agua de mar filtrada (37 mg de salinidad L-1) a una tasa creciente del 8% h-1 para garantizar una buena calidad del agua durante el ensayo. El agua disuelta promedio de O₂ alcanzó 5.3 ± 0.3 mg. El fotoperíodo se mantuvo a 12 h de luz: 12 h de oscuridad con luces fluorescentes. Las larvas de peces fueron alimentadas manualmente 14 veces al día cada 45 minutos de 8:00 a 18:00 horas. La alimentación diaria suministrada fue de 1.5 y 2 g por tanque durante la primera y segunda semana de alimentación, respectivamente. Para evitar la contribución nutricional de *Artemia* con ácidos grasos esenciales y vitaminas, esta presa viva no se agregó a los tanques de cría. A pesar de que el destete completo a partir de 14 días podría reducir el crecimiento o la supervivencia, se requirió determinar con mayor precisión el efecto de los niveles de ácidos grasos esenciales y vitaminas antioxidantes en las dietas de destete. Se formularon seis microdiets experimentales isonitrogenados e isolipídicos (tamaño de gránulos <250 μ m y 250-500 μ m) utilizando aceite de pescado (anchoa peruana) como fuente de alto contenido de HUFA n-3 solo para dietas que contienen 3% de HUFA n-3 (Tabla 5) . Por lo tanto, se evaluaron seis dietas experimentales (0.4 / 150/180, 0.4 / 300/180, 0.4 / 300/360, 3/150/180, 3/300/180, 3/300/360) de acuerdo con HUFA, vitamina E y niveles de vitamina C respectivamente. Para determinar el rendimiento de las larvas, se determinó el peso corporal seco y la longitud total de 30 peces por tanque al comienzo, a 24 (dah) y 20 peces por tanque al final del ensayo.



Tabla 5. Ingredientes variables y composición proximal (g 100 g-1 dw) de dietas de destete temprano que contienen varios niveles de HUFA n-3, vitamina E y vitamina C alimentados a larvas de corvina (*A. regius*) de 14 a 28 dah.

	Diets					
	0.4/150/180	0.4/300/180	0.4/300/360	3/150/180	3/300/180	3/300/360
<i>Ingredients</i>						
Peruvian anchovy oil	0.00	0.00	0.00	10.00	10.00	10.00
Oleic acid ^a	10.00	10.00	10.00	0.00	0.00	0.00
Vitamin E*	150.00	300.00	300.00	150.00	300.00	300.00
Vitamin C*	180.00	180.00	360.00	180.00	180.00	360.00
<i>Proximate composition</i>						
Lipid	16.01	17.09	17.06	17.52	17.34	17.44
Protein	65.14	64.72	64.97	65.43	65.45	64.88
Moisture	10.32	10.59	9.38	9.67	9.39	9.35
Ash	5.47	5.55	5.70	5.88	5.73	5.81

Como resultado del período experimental que alimenta las diferentes dietas, se pudo observar que la utilización del 3% de HUFA n-3 en la dieta larvaria mejoró el crecimiento larvario (Fig. 15) y la suplementación de vitaminas antioxidantes significativamente ($P < 0.05$) Mejora del crecimiento larvario, independientemente del nivel de HUFA n-3 en la dieta (Fig. 15)

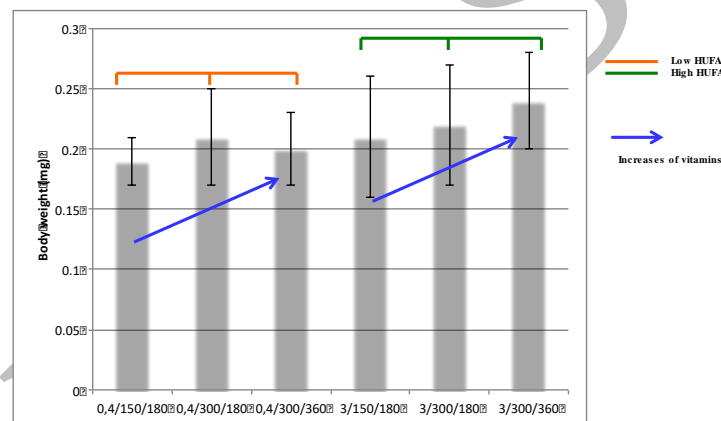


Figura 15. Crecimiento de larvas de corvina después de 10 días alimentando dietas experimentales.

2.1.2.-Importancia de las vitaminas dietéticas A, K y D en dietas de destete para corvina.

Siguiendo protocolos similares descritos anteriormente, las larvas de corvina (longitud total inicial 7.2 ± 0.7 mm; peso corporal seco 0.5 ± 0.1 mg) se distribuyeron al azar en 15 tanques experimentales con una densidad de 2100 larvas por tanque y se alimentaron con una de las cinco dietas experimentales probadas en Se triplica durante 14 días, a una temperatura promedio del agua de 24.5 ± 0.5 ° C. Las condiciones experimentales fueron iguales a las descritas anteriormente. La alimentación diaria suministrada fue de 2 y 4 g por tanque durante la primera y la segunda semana de alimentación, respectivamente. Se formularon cinco microdiets experimentales isonitrogenados e isolipídicos (tamaño de gránulo $< 250 \mu\text{m}$ y $250-500 \mu\text{m}$) utilizando polvo de calamar no desgrasado como fuente de proteínas y lípidos, y se completaron con Krill-PL como fuente de fosfolípidos marinos y nivel de vitamina E (1.500 mg kg^{-1}), vitamina C (3.600 mg kg^{-1}), gelatina (3.0), premezcla mineral ($4.5 \text{ g} / 100 \text{ g}$), premezcla de vitaminas ($6.0 \text{ g} / 100 \text{ g}$) sin menadiona, ergocalciferol y acetato de retinol (Tabla 6). Además, se añadió menadiona como fuente de vitamina K a la mezcla de vitaminas (175 mg kg^{-1}) en



todas las dietas, excepto en C-Vit K (dieta sin dieta de suplementos de vitamina K), y se agregó ergocalciferol como fuente de vitamina D a la vitamina mezcla (37 mg kg⁻¹) en todas las dietas excepto en C-Vit D (dieta sin suplementos de vitamina D) y acetato de retinol como fuente de vitamina A se agregó a la mezcla de vitaminas (3 mg kg⁻¹) en todas las dietas excepto a C-Vit A (dieta sin suplementos de vitamina A). La taurina (2.000 mg kg⁻¹) se agregó solo a la dieta C + Taurina (dieta con dieta de adición de taurina). La dieta con suplementos de vitamina K, D y A y sin adición de taurina se consideró como una dieta de control (C) (Tabla 6). Para determinar el estado de bienestar, se realizó una prueba de resistencia al estrés al final del ensayo con 30 larvas que se manipularon fuera del agua en una red de limpieza durante 30 segundos. La supervivencia final se calculó individualmente contando todas las larvas vivas al principio y al final del experimento.

Tabla 6. Ingredientes y composición próxima de las dietas de destete temprano alimentadas a larvas de corvina (*Argyrosomus regius*) de 20 a 33 días. (Dieta de control C; control de C + taurina con suplementos de taurina; control de C-Vit K sin suplementos de vitamina K; control de C-Vit D sin suplementos de vitamina D; control de C-Vit A sin suplementos de vitamina D).

Ingredients	Diets				
	C	C+Taurine	C-Vit K	C-Vit D	C-Vit A
Taurine ¹	0.0	200.0	0.0	0.0	0.0
Vit K ¹	17.3	17.3	0.0	17.3	17.3
Vit D ^k	3.7	3.7	3.7	0.0	3.7
Vit A ¹	0.3	0.3	0.3	0.3	0.0
<i>Proximate composition (%)</i>					
Crude lipids	16.4	16.2	16.5	17.1	17.9
Crude protein	76.0	75.9	76.4	76.4	76.1
Moisture	13.7	13.6	13.6	13.8	13.8
Ash	6.5	6.5	6.5	6.6	6.5
Taurine ¹	4.0	5.8	4.0	4.0	4.0
Vitamin K ²	2.4	2.4	0.0	2.6	2.2
Vitamin D ³	28.9	29.0	30.4	2.3	27.4
Vitamin A ⁴	4.2	4.3	4.2	4.3	4.1

Después del período de alimentación, la suplementación con Vit A o D (dietas C y C + Taurina) indujo una reducción del crecimiento. La falta de suplementos de vitamina K (Dieta C-vit K) indujo una alta reducción de la supervivencia larvaria (Tabla 7).

Tabla 7. Longitud total (mm), peso seco (mg) y supervivencia de larvas de corvina alimentadas con dietas de destete temprano de 20 a 33 dah (longitud total inicial 7.2 ± 0.7 mm y peso corporal seco 0.5 ± 0.1 mg). (Dieta de control C; control de C + taurina con suplementos de taurina; control de C-Vit K sin suplementos de vitamina K; control de C-Vit D sin suplementos de vitamina D; control de C-Vit A sin suplementos de vitamina D).

		Diets				
		C	C+Taurine	C-Vit K	C-Vit D	C-Vit A
Total length	26 dah	8.3±1.0 ^a	8.5±0.9 ^a	8.5±1.0 ^a	8.9±1.0 ^b	8.6±1.0 ^a
	33 dah	11.5±1.7 ^a	11.7±1.3 ^a	12.8±1.6 ^{b*}	12.6±1.3 ^b	12.2±1.7 ^b
Body weight	26 dah	0.7±0.1 ^a	0.8±0.1 ^a	0.7±0.1 ^a	0.9±0.2 ^b	0.8±0.2 ^a
	33 dah	2.4±0.6 ^a	2.3±0.4 ^a	3.2±0.2 ^{b*}	3.3±0.2 ^b	2.5±0.3 ^a
Survival (%)		16.7±6.5	12.9±1.2	7.1*	17.7±12.3	19.0±0.5

A los 33 días después de la eclosión, se encontró una alta incidencia de granulomas en larvas alimentadas sin suplementación de vitamina K (C-Vit K) (12.5%), seguidas de larvas alimentadas sin suplementación



de vitamina A (C-Vit A) y sin suplementación de vitamina D (8,3% y 3,3%, respectivamente) (Tabla 8). Las larvas de control y las dietas taurinas no mostraron granulomas. Las larvas con granulomas se tiñeron con la técnica Ziehl-Neelsen para que la detección de Mycobacteria fuera negativa para todos los casos.

Tabla 8. Porcentaje de larvas totales afectadas con granuloma y porcentaje de larvas afectadas con granuloma en estadios I y II.

Diets	33 dah		
	Total	Stage I	Stage II
C	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0
C+Taurine	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0
C-Vit K	12.5±10.6	5.0±7.1	7.5±3.5
C-Vit D	3.3±2.9	1.7±2.9	1.7±2.9
C-Vit A	8.3±10.4	6.7±7.6	1.7±2.9

Se consideró “estadio I” aquellos granulomas de 0.5 mm compuestos por un grupo central de macrófagos voluminosos (Fig. 16.a) y granulomas tardíos o “Estadio II”, granuloma de 1.8 mm estaban compuestos por un área central necrótica eosinofílica rodeada por varias capas concéntricas de macrófagos que presentaban citoplasma vacuolizado, observándose más aplanadas en las capas externas. Las células hepáticas alrededor de los granulomas se comprimieron (Fig. 16.b).

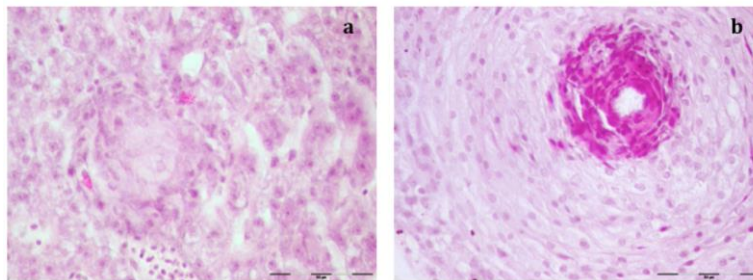


Figura 16. a. Granuloma inicial o "estadio I" en el hígado (40x). segundo. Granuloma "en estadio II" en el hígado (40x).

2.1.3.- Mejora de la calidad de fritura de corvina con suplementos de vitamina K

Como se demostró que la vitamina K es crucial en el desarrollo de granulomas sistémicos, la falta de vitamina K en la dieta se relaciona con una mayor incidencia de deformidades en las vértebras y el esqueleto caudal (Udagawa 2001), causando la formación de hueso delgado y débil, y la inducción de anomalías en la estructura ósea, como la fusión vertebral y la irregularidad de la hilera, tanto en el desarrollo temprano como durante el crecimiento posterior, se realizó un experimento con niveles graduales de suplementos de vitamina K (en forma de menadiona sb). Se ensayaron cinco niveles diferentes de suplementación, 0, 4.3, 8.6, 17.3 y 35 mg de dieta de menadiona / kg, dietas K0, K25, K50, K100 y K200 respectivamente. Los resultados mostraron que la suplementación con menadiona incrementó la supervivencia larvaria, excepto por el nivel más alto de suplementación, en el cual aumentó la mortalidad larvaria (Fig. 17). Las deformidades graves de la larva disminuyeron a medida que la suplementación con menadiona aumentó en la dieta (Fig. 18).

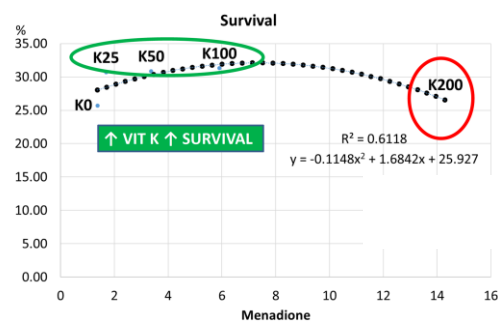


Figura 17. Supervivencia de las larvas de corvina alimentadas con dietas con diferentes niveles de Vit K.

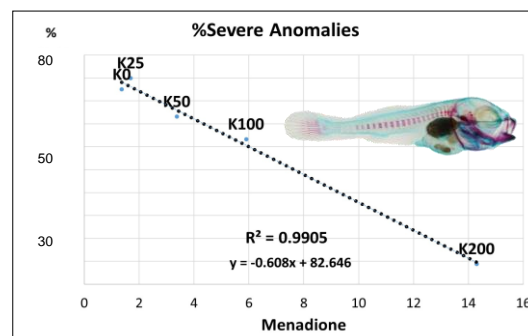


Figura 18. Porcentaje de anomalías graves en larvas de corvina que se alimentan de niveles graduales de vit K

2.1.4. Destacados para mejorar las dietas de destete larvales.

- ✓ El 0,4% de HUFA en la dieta no es suficiente para cubrir los requerimientos de ácidos grasos esenciales de la larva corvina y, debido a su elevación de hasta 3%, la absorción de lípidos mejora notablemente, los niveles de ácidos grasos esenciales y el crecimiento.
- ✓ Altos requerimientos de vitamina E y vitamina C en larvas de corvina (más de 1500 y 1800 mg kg⁻¹ para la vitamina E y la vitamina C, respectivamente).
- ✓ Las dietas de destete de corvina deben complementarse con 2,4 mg / kg de vitamina K, ya que la ausencia de esta vitamina redujo notablemente la supervivencia de las larvas.
- ✓ Las larvas de corvina parecen ser muy sensibles a la hipervitaminosis D y, levemente, a la hipervitaminosis A, ya que la suplementación con estas vitaminas condujo a una reducción del crecimiento.
- ✓ 5.90 mg / kg de menadiona en la dieta muestra una tendencia a aumentar el crecimiento y la supervivencia de las larvas de corvina, sin embargo, una gran cantidad parece disminuir el crecimiento y la supervivencia, posiblemente debido a su potencial tóxico.

2.2. Determinación de requerimientos nutricionales para promover la utilización, el crecimiento y el bienestar de los alimentos.

La deficiencia de EPT se caracteriza por diferentes sintomatologías como crecimiento y supervivencia reducidos, trastornos de la natación, erosión de las aletas e infiltración de lípidos severa, particularmente en tejido de almacenamiento de lípidos, como el hígado (Izquierdo, 1996). para determinar los requisitos nutricionales y los niveles óptimos de n-3 LC-PUFA para alevines de corvina, evaluando sus efectos sobre la supervivencia, el rendimiento del crecimiento, la utilización de alimento y la composición de los peces. Además, el presente estudio tuvo como objetivo mejorar la comprensión de la acción de modulación del LC-PUFA n-3 en la dieta sobre el perfil lipídico hepático y su posible papel en el desarrollo de la esteatosis hepática y la granulomatosis en la corvina.



Se realizó un ensayo de alimentación con alevines de corvina con un peso corporal inicial de 2.80 ± 0.23 g (media \pm SD) y una longitud total inicial de 6.37 ± 0.20 cm (media \pm SD). Grupos triplicados de alevines de corvina, producidos en las instalaciones de la Universidad de Las Palmas de Gran Canaria, se distribuyeron al azar en 15 tanques experimentales (tanques cilíndricos de fibra de vidrio de 200 l con fondo cónico y pintados de color gris claro) a una densidad de 45 peces por tanque y se alimentaron manualmente una de las dietas experimentales hasta la aparente saciedad visual, tres veces al día, 6 días a la semana, durante 30 días. La ingesta diaria de alimento se calculó registrando el consumo de la dieta y restando los sedimentos no consumidos del tanque. Los tanques se instalaron en un sistema abierto y se suministraron con agua de mar filtrada (37 mg de salinidad L⁻¹). El agua se aireó continuamente y el oxígeno disuelto se mantuvo por encima de 6.0 ± 0.2 mg L⁻¹ durante el ensayo. La temperatura promedio del agua a lo largo del ensayo fue de 23.0 ± 0.2 °C. El experimento se realizó bajo fotoperíodo natural. Se formularon cinco dietas experimentales isoproteicas e isolipídicas que contenían aceite de pescado (FO) y aceites vegetales (VO; linaza, palma y aceites de colza) como fuentes de lípidos. Se definieron cinco niveles crecientes en la dieta de LC-PUFA n-3: 0.8, 1.4, 2.0, 2.6 y 3.6% de materia seca, donde DHA y EPA representaron el 93% del total de LC-PUFA n-3. El contenido deseado de n-3 LC-PUFA de cada dieta experimental se logró reemplazando sucesivamente el VO por FO. La composición de la dieta y el análisis próximo se muestran en la Tabla 9. Las dietas experimentales fueron fabricadas por la planta de tecnología de alimentación ARC Skretting (Stavanger, Noruega) con un tamaño de pellet de 2 mm.

Tabla 9. Composición (%) y análisis próximo de las dietas experimentales para alevines de corvina

	Dietary n-3 LC-PUFA level (% DM)				
	0.8	1.4	2.0	2.6	3.6
<i>Ingredients (%)</i>					
Fish meal, N. Atlantic ¹	15.0	15.0	15.0	15.0	15.0
Corn gluten ²	10.0	10.0	10.0	10.0	10.0
Faba beans ¹	10.0	10.0	10.0	10.0	10.0
Wheat ¹	8.0	8.0	8.0	8.0	8.0
Wheat gluten ¹	18.4	18.4	18.4	18.4	18.4
Soy protein concentrate ¹	25.0	25.0	25.0	25.0	25.0
Fish oil, S. American ¹	0.0	2.7	5.4	8.2	10.9
Linseed oil ³	1.6	1.2	0.8	0.4	0.0
Palm oil ³	3.3	2.5	1.7	0.8	0.0
Rapeseed oil ¹	6.0	4.5	3.0	1.5	0.0
Premix ⁴	2.8	2.8	2.8	2.8	2.8
<i>Proximate analysis (% DM)</i>					
Protein	56.5	54.5	54.5	56.0	54.3
Lipids	16.2	17.0	16.5	16.9	16.2
Ash	4.9	5.0	5.1	5.2	5.0
Moisture	8.7	8.5	8.5	8.2	7.9

1: Skretting, Stavanger, Noruega;

2: Cargill Nordic AS, Charlottenlund, Dinamarca;

3: AAK AB, Karlshamn, Suecia;

4: Trouw Nutrition, Boxmeer, Países Bajos. Composición patentada Skretting ARC, incluidas vitaminas y minerales;

La suplementación con vitaminas y minerales se estima que cubre los requisitos de acuerdo con la NRC (2011).

Durante la prueba de alimentación, no se observó daño externo o comportamiento anormal. La supervivencia fue alta en todos los tratamientos y no se vio afectada por la composición de la dieta (Tabla 10). Después de 30 días de alimentación, el peso final de la corvina varió desde 9,5 (en peces alimentados con 0,8 n-3 de dieta LC-PUFA) hasta 10,7 g (en aquellos alimentados con 2,6 n-3 de dieta LC-PUFA), logrando un aumento de 3 veces desde el inicio peso corporal. Los peces alimentados con 0,8% de n-3 LC-PUFA dieta mostraron los valores más bajos para la longitud total, el peso corporal, WG, SGR y TGC. Incremento en la dieta n-3 LC-PUFA, significativamente ($P < 0.05$) incrementó la



longitud total final y el peso corporal. Por lo tanto, la mayor longitud total se encontró en peces alimentados con 2.6% de n-3 LC-PUFA en la dieta, siendo significativamente más alto que los peces alimentados con 0.8%, 1.4% o 3.6% de n-3 LC-PUFA. El peso corporal más alto también se encontró en peces alimentados con 2.6% n-3 LC-PUFA, siendo significativamente más alto que aquellos alimentados con 0.8% n-3 LC-PUFA. El aumento de LC-PUFA n-3 dietético se correlacionó significativamente con el peso corporal final ($P = 0.09$, $r^2 = 0.82$), WG ($P = 0.05$, $r^2 = 0.86$), SGR ($P = 0.01$, $r^2 = 0.94$) o TGC ($P = 0.01$, $r^2 = 0.94$).

Tabla 10. Rendimiento de crecimiento de alevines de corvina alimentados con dietas experimentales durante 30 días-1

	Dietary n-3 LC-PUFA level (% DM*)				
	0.8	1.4	2.0	2.6	3.6
Survival (%)	93.3±0.7	97.8±1.3	99.3±0.7	94.8±1.5	97.8±2.2
Initial total length (cm)	6.4±0.0	6.3±0.1	6.3±0.0	6.4±0.0	6.2±0.0
Final total length (cm)	9.0±0.1 ^c	9.4±0.1 ^b	9.3±0.1 ^{ab}	9.6±0.1 ^a	9.3±0.1 ^{bc}
Initial body weight (g)	2.8±0.1	2.8±0.1	2.7±0.1	2.7±0.1	2.6±0.1
Final body weight (g)	9.5±0.3 ^b	10.4±0.3 ^a	10.2±0.4 ^{ab}	10.7±0.3 ^a	10.4±0.3 ^a
WG (g)	6.7±0.4	7.5±0.4	7.6±0.3	8.0±0.3	7.8±0.2
SGR (% day ⁻¹)	4.1±0.1	4.3±0.2	4.5±0.1	4.5±0.1	4.6±0.1
TGC	1.0±0.0	1.1±0.1	1.1±0.0	1.2±0.0	1.2±0.0
FI (g feed fish ⁻¹ day ⁻¹)	0.2±0.0	0.2±0.0	0.2±0.0	0.2±0.0	0.2±0.0
FCR	0.8±0.1	0.7±0.0	0.7±0.0	0.7±0.0	0.7±0.0
K (%)	1.3±0.0	1.3±0.0	1.3±0.1	1.2±0.1	1.3±0.0
PER	2.4±0.2	2.6±0.1	2.5±0.1	2.6±0.1	2.6±0.1

La ingesta de alimento no se vio afectada por el tratamiento dietético, y los peces alimentados con el 2,6% de n-3 LC-PUFA mostraron el mejor K, pero no significativamente diferentes de los peces alimentados con otros niveles de n-3 LC-PUFA. El modelo lineal de línea discontinua se ajustó mejor a la relación dietética n-3 LC-PUFA con la longitud final, peso final, WG, SGR o TGC y señaló un requisito de 2.1% n-3 LC-PUFA para el máximo crecimiento de alevines de corvina (Es decir, WG mostrado en la Fig. 19).

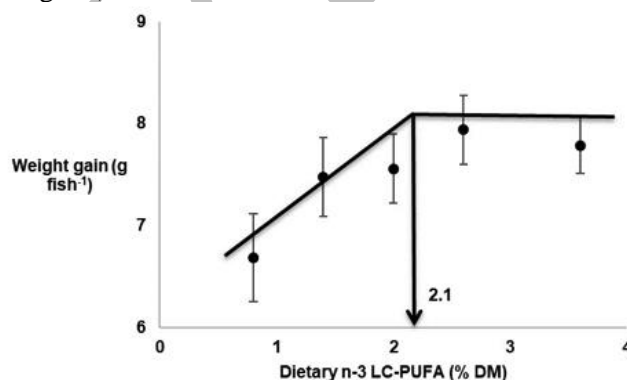


Figura 19. Modelo lineal de línea discontinua que se ajusta a los niveles de LC-PUFA n-3 para el aumento de peso de los alevines de corvina alimentados con dietas experimentales durante 30 días; la flecha indica el requisito de LC-PUFA n-3 dietético (% DM).

El contenido de ácidos grasos de los juveniles reflejó el perfil de ácidos grasos de la dieta, reteniendo selectivamente los ácidos grasos esenciales en aquellos animales que ingieren niveles más bajos de ácidos grasos esenciales en la dieta (Tabla 11).

**Tabla 11.** Eficiencia de retención (acumulación o reducción neta) de ácidos grasos específicos en todo el cuerpo de alevines de corvina alimentados con dietas experimentales durante 30 días-1

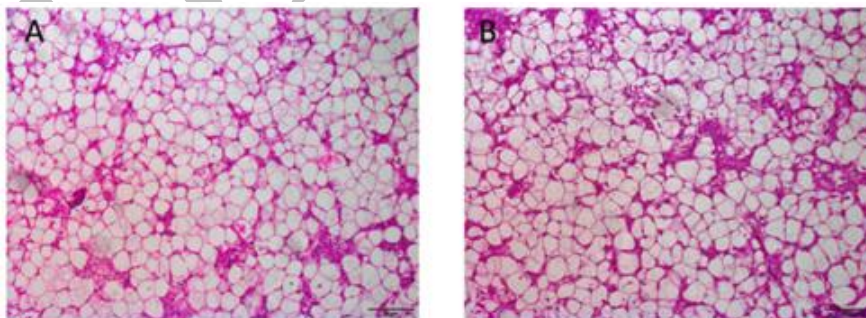
Fatty acid	Dietary n-3 HUFA level (% DM)				
	0.8	1.4	2.0	2.6	3.6
18:2n-9	251.9±43.0 ^a	125.7±16.5 ^b	55.1±16.2 ^b	47.2±1.2 ^b	37.7±1.4 ^b
18:3n-6	190.8±44.8	107.8±14.7	48.2±13.7	40.9±2.4	65.5±12.6
18:4n-3	23.3±3.6	26.9±4.7	14.6±4.3	18.9±3.3	30.0±3.2
18:3n-3	25.7±5.3 ^b	38.7±4.1 ^{ab}	24.5±4.3 ^b	31.7±2.9 ^b	56.8±5.2 ^a
20:3n-3	315.0±88.6 ^a	256.1±24.6 ^{ab}	136.6±12.9 ^{abc}	50.8±0.6 ^b	68.2±10.7 ^b
20:2n-6	227.8±57.4 ^a	165.4±11.4 ^{ab}	114.2±12.8 ^{ab}	82.2±110.7 ^b	86.5±10.3 ^{ab}
20:4n-6	55.0±18.2	57.2±2.8	28.7±8.9	32.9±3.0	53.1±6.7
20:5n-3	25.0±6.7	31.3±4.4	13.3±4.7	17.9±4.1	30.3±4.3
22:6n-3	56.1±5.8 ^a	41.4±3. ^b	41.5±4.7 ^b	37.5±0.7 ^b	39.9±3.7 ^b

El examen histológico de la sección transversal del tejido hepático mostró que no se encontró tejido necrótico en la corvina alimentada con diferentes niveles dietéticos de LC-PUFA n-3. Sin embargo, el hígado de pescado alimentado con un 0,8% de n-3 LC-PUFA mostró un grado significativamente mayor de esteatosis que los alimentados con > 2% de n-3 LC-PUFA. Además, a pesar de que el examen general no reveló la presencia de lesiones granulomatosas en ningún órgano de ningún pez, los alimentados con el nivel más bajo de LC-PUFA n-3 en la dieta (0,8%) presentaron un mayor número ($P < 0,05$) de granulomas hepáticos que el pescado □ 0,2% n-3 LC-PUFA (Tabla 12).

Tabla 12. Evaluación histomorfológica del tejido hepático de la corvina alimentados con dietas experimentales durante 30 días.

	Dietary n-3 LC-PUFA level (% DM*)				
	0.8	1.4	2.0	2.6	3.6
Steatosis ²	2.6 ^a ±0.2	2.4 ^{ab} ±0.2	1.7 ^{ab} ±0.2	1.2 ^b ±0.0	1.2 ^b ±0.2
Granulomas ³	5.3 ^a ±1.6	2.1 ^{ab} ±1.1	1.4 ^b ±1.0	0.1 ^b ±0.1	0.7 ^b ±0.4

El hígado de peces alimentados con 0,8 y 1,4% de n-3 LC-PUFA presentó una esteatosis grave, reflejada por la hipertrofia de los hepatocitos (Fig. 20 A y B). Además, en el mismo pez, se observó una infiltración extensa de la vacuolización de lípidos, en hepatocitos y, en consecuencia, los núcleos se desplazaron de la posición central en la célula a la periferia. Las alteraciones esteatóticas hepáticas disminuyeron linealmente con el aumento de los niveles de LC-PUFA n-3 en la dieta ($r_2 = 0.88$, $P = 0.19$).

**Figura 20.** Secciones hepáticas de corvina alimentadas con diferentes niveles de LC-PUFA n-3 teñidas con H&E, Barras 50 µm: (A) 0,8% n-3 LC-PUFA; (B) 1.4% n-3 LC-PUFA.



Destacados sobre los requerimientos de ácidos grasos esenciales por parte de juveniles de corvina.

- ✓ La corvina demostró la capacidad de conservar selectivamente la FA clave, en particular el DHA y ARA sobre la otra FA, en respuesta a la deficiencia de EPT.
- ✓ Los alevines de corvina tienen un requerimiento de HUFA n-3 de 2.1% de MS en dietas que contienen 16.5% de lípidos de DM, 0.9 EPA / DHA y 0.4% de ARA del contenido total de AF.
- ✓ La corvina deficiente en EFA mostró una mayor incidencia de granulomas que los peces alimentados niveles adecuados de HUFA n-3 en la dieta
- ✓ Las alteraciones esteatóticas hepáticas disminuyeron linealmente con el aumento de los niveles de LC-PUFA n-3 en la dieta.

DIVERSIFY



3. Cultivo Larvario

Condiciones óptimas para la cría de larvas.

(Dirigido por IRTA, Alicia Estevez)

La crianza de larvas de corvina se realiza generalmente siguiendo un protocolo basado en la cría de larvas de lubina y dorada europea. Sin embargo, diferentes estudios han revelado que estos protocolos deben adaptarse a las demandas biológicas de esta especie, ya que las larvas de corvina son muy sensibles al estrés producido por la alta intensidad de luz (más de 500 lux), fotoperíodos largos o altas densidades de presas vivas (Roo et al., 2010; Vallés y Estévez, 2013). Aunque se están estudiando los requerimientos nutricionales precisos, las larvas muestran muy buenas tasas de crecimiento y supervivencia utilizando productos de enriquecimiento disponibles comercialmente para presas vivas (Vallés y Estévez, 2015). Los productores de Corvina no consideran que la cría de larvas sea un cuello de botella importante para el cultivo de corvina (Lazo et al, 2010). Por otro lado, el canibalismo y la distribución de tamaño variable en los juveniles se consideran una preocupación principal, ya que reducen el rendimiento de la producción y aumentan el costo de producción. Además, estos problemas pueden derivarse de o modularse mediante la alimentación de alimentos vivos como los nauplios de Artemia. Por lo tanto, avanzar en el destete temprano de las larvas de su dependencia de Artemia a un alimento seco es una prioridad y el enfoque principal del trabajo larvario en la corvina. El destete se define como el cambio de alimentos vivos a una dieta inerte, en un momento muy crítico durante el desarrollo, que requiere protocolos dietéticos graduales y específicos para el éxito del proceso (Parma y Bonaldo, 2013). En este sentido, un mejor conocimiento de la fisiología digestiva de las larvas bajo un nuevo protocolo de alimentación contribuirá a la optimización del proceso de destete y puede ayudar a comprender las limitaciones funcionales en la capacidad de procesamiento del sistema digestivo para suministrar nutrientes a los tejidos larvales de rápido crecimiento. un protocolo de destete anterior.

En el proyecto Diversify, llevamos a cabo 2 ensayos con huevos fertilizados de corvina obtenidos en 2014 y 2015 de un reproductores silvestres mantenidos en tanques circulares de 4000 L conectados a unidades de recirculación (IRTAMar®) en el Centro IRTA de San Carles de la Rápita (España) bajo Condiciones controladas y después de la inducción hormonal. Los huevos flotantes se almacenaron en recipientes cilíndricos de PVC de 35 l provistos de sistemas de transporte aéreo y un alto suministro de aireación. El día 2 después de la eclosión (dph), las larvas se almacenaron en tanques de 100 l con una densidad de 100 larvas L-1 y se cultivaron de 2 a 37 dph en diferentes tratamientos dietéticos. Los tanques de 100 L también se conectaron a unidades IRTAMAR®. La temperatura (18.2 ± 0.5 °C), la salinidad (35.4 ± 0.3 g L-1), el oxígeno disuelto (7.9 ± 0.3 mg L-1) y el pH (7.9 ± 0.2) se verificaron diariamente, mientras que los nitritos (<0.25 mg L-1) y amoníaco (<0.07 mg L-1) fueron revisados una vez por semana. La intensidad de la luz se mantuvo a 500 lux en la superficie del agua y el régimen de luz fue de 12 h de luz: 12 h de oscuridad. Las larvas fueron alimentadas con rotíferos enriquecidos (*Brachionus* sp) desde 2 dph hasta 14 dph y Artemia metanauplii desde 9 dph. Ambas presas vivas se enriquecieron utilizando pimiento rojo (Bernaqua, Bélgica) durante 12 h a 28 °C en el caso de rotíferos y 6 h a 25 °C en el caso de Artemia. Las larvas fueron alimentadas con dos dosis de presas vivas (mañana y tarde) cada día, mientras que la alimentación seca (Gemma Micro, Skretting) se administró a mano cada mañana a las 9 h y utilizando alimentadores automáticos cada hora, de 9:00 a 20:00 h. La cantidad de alimento se ajustó para alcanzar el nivel de saciedad de alimentación aparente. Todos los días, el fondo de los tanques se sifonaba para eliminar los peces muertos, los alimentos no consumidos y las heces. Dos experimentos se llevaron a cabo con larvas de corvina en 2014 (ensayo 1 con 4 protocolos diferentes para el destete temprano, vea el esquema a continuación) y 2015 (ensayo 2 con 2 protocolos para el destete temprano) como se describe a continuación y se muestra esquemáticamente (Fig.21).

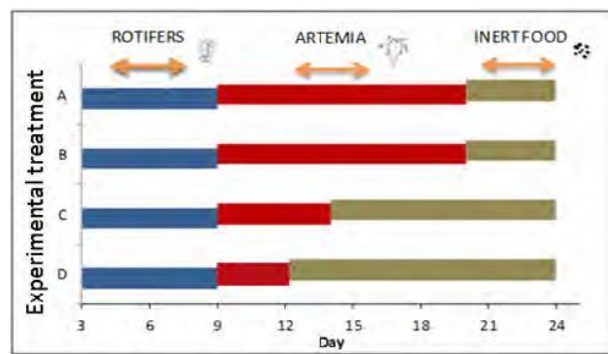


Figura 21. Grupo A: el destete en alimento seco comenzó a partir de 20 dph y se completó en 30 dph, (grupo de control); Grupo B: el destete comenzó a partir de 20 dph y se completó con 30 dph (igual que el control pero usando la mitad de Artemiauplii de Artemia); Grupo C: el destete comenzó a partir del 15 y se completó el 25 dph; Grupo D: el destete comenzó a partir de 12 dph y se completó con 23 dph, con tres repeticiones cada uno.

En el experimento realizado en 2014, se recolectaron aleatoriamente 10 larvas cada semana para medir el crecimiento (SL y DW). Los peces fueron anestesiados con MS-222. Para el peso seco, las larvas se colocaron en cubreobjetos de vidrio, se secaron en un horno a 60°C durante la noche y se pesaron en un micro balance (Mettler, MX5, España). Para examinar el desarrollo del sistema digestivo, se tomaron muestras de 10 larvas de cada uno de los tres tanques replicados en 10 dph (grupos A, B, C, D), 15 dph (grupo D), 18 dph (grupo C), 23 dph (Grupos A, B, C, D) y 35 dph (grupos A, B, C, D). Las larvas se recolectaron al azar cuando se inició el destete y se cambió la alimentación de dietas vivas a inertes a 12 dph (grupo D), 15 dph (grupo C), 20 dph (grupos A, B) y 35 dph, para analizar el desarrollo de las enzimas digestivas, y actividades enzimáticas antioxidantes.

Resultados.- Los resultados en términos de rendimiento de crecimiento de las larvas se muestran en la Fig. 22, mientras que los valores de supervivencia se muestran en la Fig. 23. El grupo C, destetado a 15 dph y alimentado con la mitad de Artemiauplii de Artemia mostró resultados finales similares en peso que el grupo control (A) ($P > 0.05$), pero exhibió una longitud más larga que en todos los otros grupos ($P < 0.05$). Aunque en este grupo la incidencia de canibalismo y, posteriormente, el crecimiento en la longitud de algunos individuos, fue mayor que en el resto de los grupos, con la excepción del grupo D que mostró la tasa de mortalidad más alta ($P < 0.05$). Por otro lado, el grupo B mostró un crecimiento significativamente menor en peso y longitud y la tasa de supervivencia más alta con menor incidencia de canibalismo (ver fotografías en la Fig. 24) ($P < 0.05$) y una distribución similar de tamaño entre las larvas.

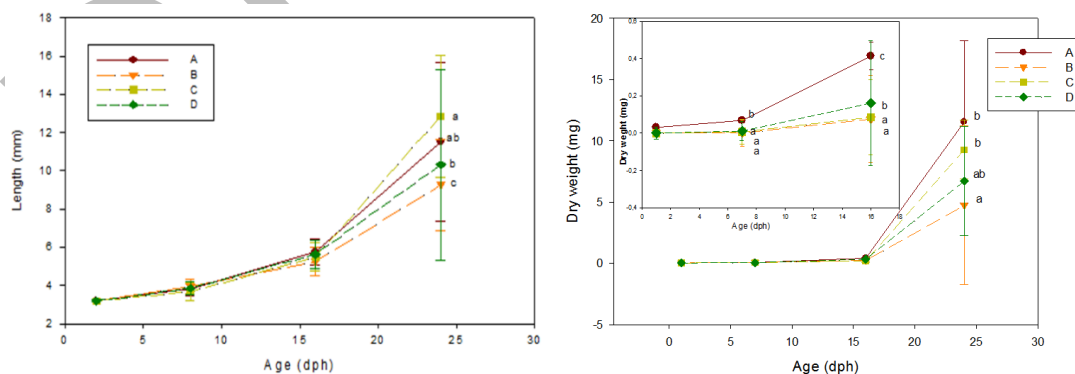


Figura 22. Rendimiento de crecimiento de larvas de corvina (media \pm desviación estándar), longitud (izquierda) y peso seco (derecha). La figura insertada a la derecha muestra el crecimiento larvario durante el primer período larvario (1-15 dph). Diferentes letras minúsculas muestran diferencias significativas (ANOVA, $P < 0.05$)



La tasa de supervivencia fue muy baja en todos los grupos (1.2 a 2.8%, Fig. 3), y al final del experimento se detectaron grandes diferencias en el crecimiento de larvas en cada tanque como se muestra en la Fig. 24, debido a la alta incidencia de canibalismo. Las diferencias en el peso seco entre larvas pequeñas, medianas y grandes también se muestran en la Tabla 13, con larvas que pesan de 1.28 a 38.28 mg de peso seco dependiendo del grupo.

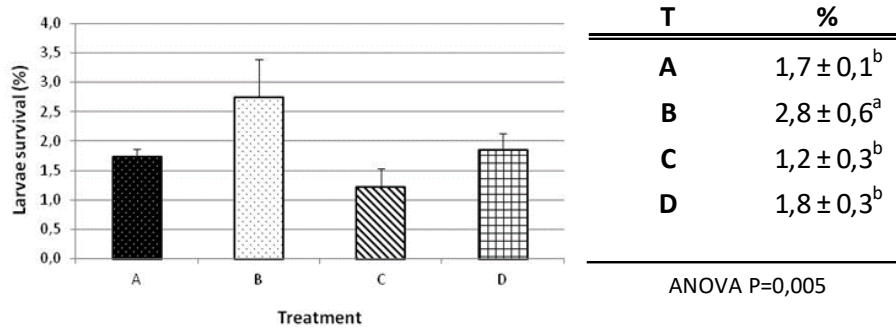


Figura 23. Supervivencia de larvas de corvina de cada tratamiento.



Figura 24. Diferencia en el canibalismo y una distribución similar de tamaño entre las larvas.

Tabla 13. Diferencias en peso seco (mg, media ± desviación estándar) entre larvas pequeñas, medianas y grandes en los cuatro grupos de alimentación (grupos A, B, C y D).

T	Small	Medium	Large
A	4,52 ± 0,97	16,06 ± 9,58	38,28 ± 8,41
B	1,28 ± 0,16	8,00 ± 7,69	18,67 ± 9,75
C	3,73 ± 1,55	12,27 ± 3,79	23,17 ± 5,11
D	3,01 ± 1,29	8,91 ± 3,89	26,41 ± 2,77

Los resultados del ensayo realizado en 2015 fueron diferentes. El crecimiento en peso y longitud de las larvas se muestra en la Fig. 25. El crecimiento fue significativamente mayor para las larvas del grupo A (control) en comparación con las larvas destetadas tempranamente. Las tasas de supervivencia fueron alrededor del 4-5% al final del estudio (Fig. 26); estos datos estuvieron dentro del rango de valores observados en criaderos de peces comerciales. El uso de baja intensidad de luz (reducida de 500 a 150-200 lux) y el mayor número de dosis de alimentación suministradas tuvo un claro efecto sobre la reducción del canibalismo que, al mismo tiempo, permitió una mayor tasa de supervivencia.

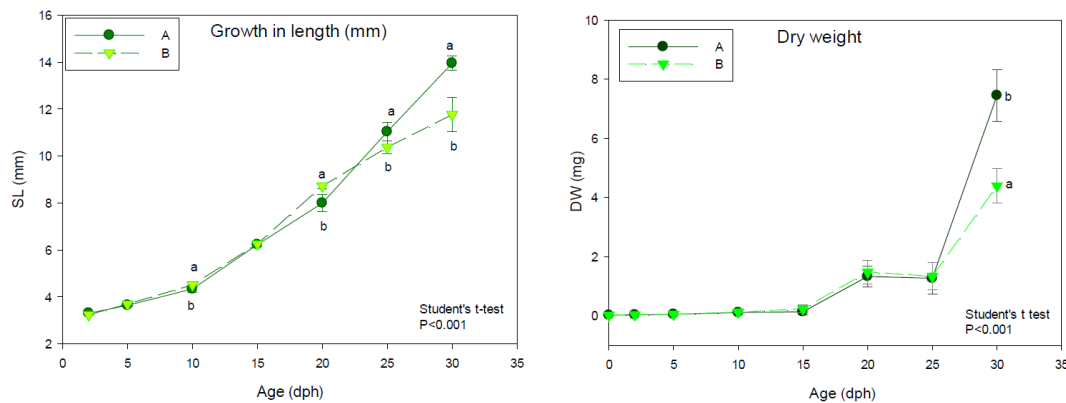
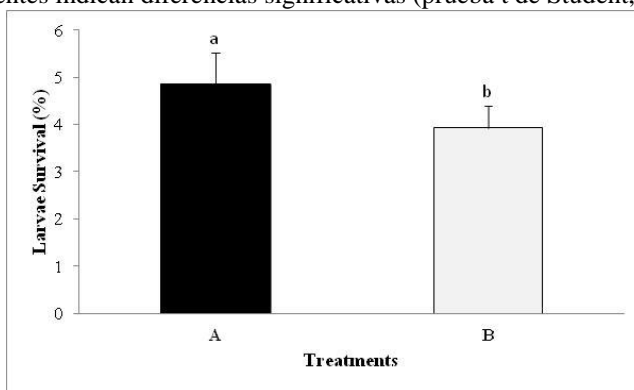


Figura 25. Crecimiento en longitud (izquierda) y peso seco (derecha) de larvas de corvina. Las letras minúsculas diferentes indican diferencias significativas (prueba t de Student, $P < 0,001$).



Survival Rate (%)	
A	$4,86 \pm 0,65^a$
B	$3,93 \pm 0,47^b$
Student's t test $P=0,032$	

Figura 26. Supervivencia de larvas obtenida en el ensayo realizado en 2015 y prueba t de Student que muestra diferencias significativas indicadas por letras minúsculas entre los dos grupos (Grupos A y B) (prueba de Student $P = 0.032$).

Actividades enzimáticas digestivas.- Resultados de la actividad enzimática expresada como actividad específica (U mg proteína⁻¹) de las larvas del ensayo 1, al inicio del destete (12 dph grupo D, 15 dph grupo C y 20 dph grupos A y B) y al final del ensayo (24 dph), así como al final del ensayo 2 (37 dph) se muestran en las Figuras 8 y 9. Los resultados muestran claramente que todas las larvas muestran una actividad enzimática similar cuando se alimentan Presas vivas (Fig. 27) y solo se pudieron encontrar diferencias en la producción de fosfatasa alcalina, siendo más altas en las larvas más jóvenes (grupos C y D). Al final de la fase de destete (Fig. 28), las enzimas pancreáticas tendían a ser más altas en las larvas destetadas tempranas, especialmente en las larvas del ensayo 2 y en las larvas del grupo C, el ensayo de larvas, con una actividad lipasa significativamente mayor en comparación con grupo control (A) ($p < 0.05$). La alfa-amilasa no mostró diferencias entre las larvas destetadas tempranas y las de control, y la tripsina también mostró una mayor actividad en las larvas destetadas tempranas ($P < 0.05$).

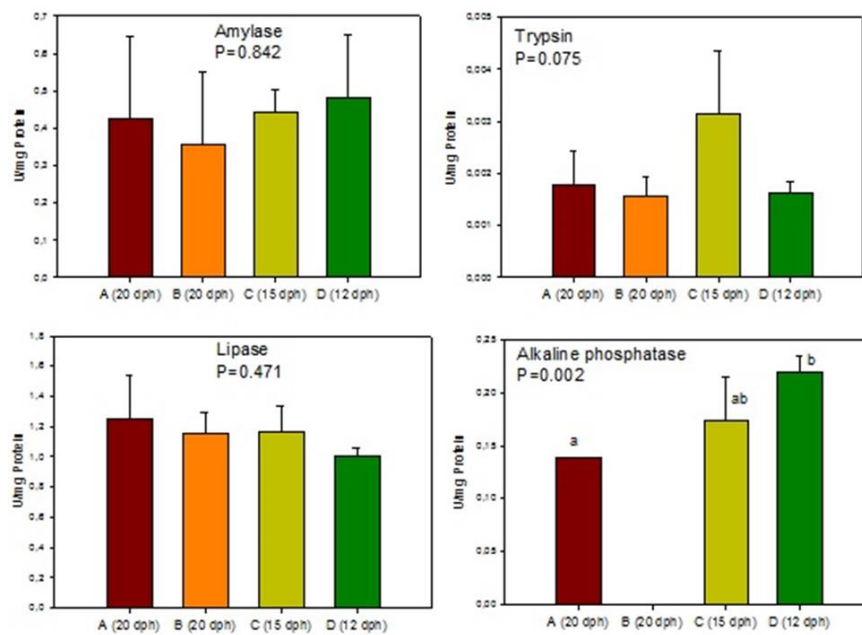


Figura 27. Resultados de la actividad de la enzima digestiva medida en las larvas a partir de 2014 al final del período de alimentación de presas vivas. Las diferentes letras minúsculas indican diferencias significativas (ANOVA, $P < 0.05$)

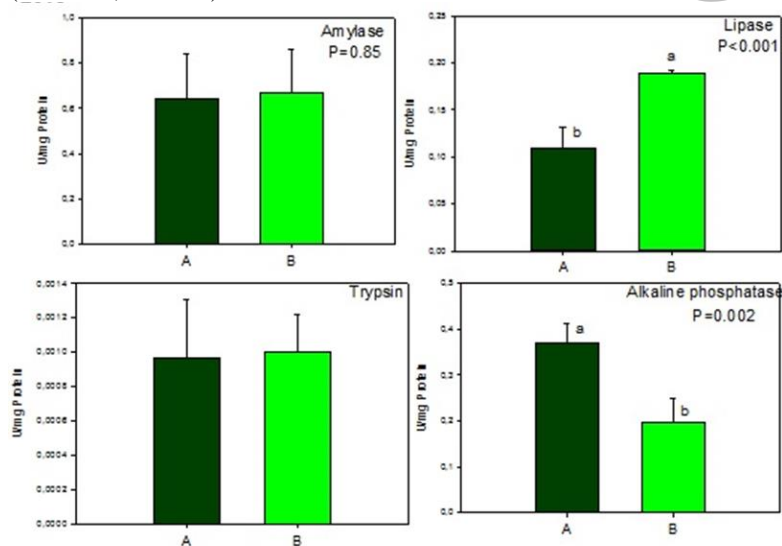


Figura 28. Resultados de la actividad de la enzima digestiva medida en las larvas del ensayo de 2015 al final de los experimentos. Las letras minúsculas diferentes indican diferencias significativas (ANOVA, datos de 2014 y prueba de la t de Student, datos de 2015, $p < 0,05$).

CONCLUSIONES Y DISCUSIÓN

El destete, la transferencia de alimentos vivos a una dieta artificial, es exitosa en la mayoría de los peces marinos con un tracto digestivo completamente desarrollado (Person Le Ruyet et al., 1993). En el estudio actual, el destete se realizó con una dieta de destete comercial (Gemma Micro, Skretting) utilizando una transferencia gradual de la presa viva a la dieta artificial durante un período mínimo de cinco días, aunque en algunas otras especies marinas como la lubina hay una Reposición brusca (Persona Le Ruyet, 1990). Duran et al (2009) que utilizaron un protocolo de destete similar al utilizado en la Prueba 2 (2015)



obtuvieron resultados similares en crecimiento y supervivencia. Por lo tanto, el destete temprano puede llevarse a cabo con larvas de corvina si existen varias medidas para reducir el canibalismo.

El canibalismo se controló en la Prueba 2 mediante el aumento de las frecuencias de alimentación, la eliminación de los individuos dominantes, la clasificación regular y el mantenimiento de las larvas en la oscuridad cuando los alimentos no estaban disponibles o escaseaban. El uso de poca intensidad de luz antes de alimentarse por la mañana aumentó la supervivencia de las larvas en el ensayo realizado en 2015 al reducir el canibalismo.

El éxito del destete de cualquier larva de peces de peces vivos en una dieta formulada depende en parte de la composición de la dieta y la capacidad de las larvas para seleccionar y digerir una dieta inerte. En este sentido, el desarrollo adecuado de protocolos de alimentación y formulaciones de dieta en condiciones de cultivo de larvas de peces requiere un profundo conocimiento y comprensión de los procesos de digestión que se producen durante la ontogenia temprana para sincronizar diferentes tipos de alimentos (presas vivas y microdiets) con la producción de diferentes Enzimas digestivas. Por lo tanto, la evaluación de la presencia y el nivel de actividad de las enzimas digestivas se puede utilizar como un indicador comparativo de la tasa de desarrollo de larvas de peces, la aceptación de los alimentos, la capacidad digestiva, así como para las predicciones de supervivencia y tasa de crecimiento. Por lo tanto, la síntesis y la secreción de enzimas digestivas se consideran indicadores de la transición de alimentos en vivo a microdiets. El proceso de secreción pancreática madura durante las primeras tres o cuatro semanas después de la eclosión en larvas de peces marinos templados. Este proceso de maduración puede interrumpirse cuando las larvas se alimentan con dietas que no satisfacen sus necesidades específicas. Las enzimas proteolíticas del páncreas exocrino se consideran particularmente significativas en las primeras etapas de la vida de los peces precoces y altriciales debido a la ausencia de un estómago funcional con pepsina. La lipasa desempeña un papel activo en la digestión de lípidos, especialmente en la descomposición del triacilglicerol en diacilglicerol y luego en monoacilglicerol. En muchas especies de peces, incluida la corvina, la lipasa es activa durante la reabsorción del glóbulo de aceite y la transición completa a la alimentación exógena es relevante para la digestión de altos niveles de triacilgliceroles presentes en la presa de vida enriquecida como *Artemia*. Por el contrario, la capacidad de digerir proteínas en el estómago (actividad de la pepsina) fue significativamente menor en las larvas destetadas tempranamente, lo que coincidió con la tasa de crecimiento significativamente menor alcanzada por este grupo. Teniendo en cuenta que la actividad de la pepsina se detecta después de la formación de un estómago funcional que en la corvina generalmente ocurre entre 15 y 20 dph (Papadakis et al., 2013; Suzer et al., 2013), varios autores han sugerido que esta edad es la mejor Para el destete de larvas de corvina. Esto se respalda en el presente estudio que indicó que 10-12 dph (edades de destete utilizadas en los experimentos) podrían ser prematuras para el destete de larvas. La débil capacidad de las larvas destetadas tempranamente para la desnaturalización y la escisión proteolítica de las proteínas de los alimentos artificiales podría ser la razón del pobre crecimiento larvario alcanzado al destete temprano.

En conclusión, en base a estos resultados, las larvas de corvina pueden ser destetadas de la alimentación en vivo a una dieta artificial tan pronto como a 10 dph, pero se deben considerar otros aspectos importantes para el éxito de la producción, incluido el rendimiento de las larvas y la supervivencia.



4. Engorde

Metodología para evitar la variabilidad de tamaño en juveniles de corvina.

(Dirigido por IRTA, Alicia Estévez y Neil Duncan)

La variabilidad en el tamaño en el pre-crecimiento juvenil hace que la clasificación regular sea esencial para evitar el canibalismo y las calificaciones de peces más pequeños pueden estar relacionadas con un bajo rendimiento cuando se transfieren a las jaulas marinas. Se llevaron a cabo experimentos con juveniles de corvina de una mezcla de 4 a 6 familias conocidas (de grupos de reproducción específicos), para simular la situación de los criaderos comerciales y para estudiar las diferencias en la tasa de crecimiento. Los peces juveniles se almacenaron en tanques por triplicado en la misma densidad inicial y se alimentaron con la misma dieta comercial (IRTA). Al final del experimento, los peces se caracterizaron genéticamente por parentesco para establecer si las diferencias en la tasa de crecimiento eran una consecuencia del origen genético. Los peces con tasas de crecimiento bajas se utilizaron para estudios de crecimiento compensatorio para determinar el potencial de crecimiento de los juveniles pequeños y estimar el costo económico del uso de estos peces para la producción, en comparación con descartar y usar solo juveniles más grandes.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se llevaron a cabo dos experimentos, uno en 2014 que mantuvo a las familias separadas durante la cría de larvas y otro en 2015 que mantuvo a las familias unidas durante la cría de larvas. En 2014 se obtuvieron seis desoves diferentes a partir de la inducción hormonal de peces pareados, que se utilizaron para la cría de larvas. Dos familias (V8-1 y C2 desovando el 24 de abril) nacieron el 28 de abril y las otras cuatro (V8-1 (2), C1, V6 y V8-2, desovando el 1 de mayo) nacieron el 5 de mayo (Tabla 14). Tres puestas fueron de familias de half-sib (familias 1-3) y tres de reproductores no relacionados (familias 4-6). Dos hembras cultivadas se usaron como reproductoras y todos los demás eran de origen silvestre.

Tabla 14. Padres que contribuyeron a cada familia o familia de medio sib y fecha de desove. El número femenino y masculino se refiere a la identificación única de los criadores y el nombre de origen del criador es salvaje o culto.

Familia	Related half-sib family	Fecha de Puesta (Tanque)	Hembra	Macho
1	2 y 3	24/04/2014 (V8-1)	5-salvaje	19- salvaje
2	1	01/05/2014 (V8-1)	5- salvaje	20- salvaje
3	1	01/05/2014 (V8-2)	1- salvaje	19- salvaje
4	-	24/04/2014 (C2)	16-cultivado	21- salvaje
5	-	01/05/2014 (C1)	2- salvaje	22- salvaje
6	-	01/05/2014 (V6)	13-cultivado	17- salvaje

En 2015, el diseño experimental se cambió de acuerdo con las sugerencias de los demás participantes en esta tarea. En este ensayo, se utilizaron cuatro desoves diferentes obtenidos de la inducción hormonal de peces pareados (Tabla 15) para la cría de larvas. Todos los desoves se obtuvieron el mismo día (13 de mayo de 2015) y después de la incubación, las larvas recién nacidas (15 de mayo de 2015) se mezclaron y distribuyeron en cuatro tanques de 1500 l.

Tabla 15. Padres que contribuyeron a cada familia y fecha de desove en 2015. El número de hembras y machos se refiere a la identificación única de los criadores y el nombre de origen del criador

Familia	Fecha de Puesta (Tanque)	Hembra	Macho	Larva eclosionada (N)
1	13/05/2015 (V7)	5-salvaje	19- salvaje	122617
2	13/05/2015 (V6)	6- salvaje	23-criad.	141983
3	13/05/2015 (V8-1)	1- salvaje	20- salvaje	66500
4	13/05/2015 (V8-2)	8- salvaje	22- salvaje	8050



Las larvas se criaron en condiciones intensivas siguiendo el protocolo estándar de la cultura corvina (Vallés y Estévez, 2015). Se utilizaron cincuenta larvas por litro como densidad inicial, un fotoperíodo de 16L: 8D, intensidad de 500 lux (Vallés y Estévez, 2013), en la superficie del agua, y se alimentaron con rotíferos enriquecidos de 2 a 14 días después de la eclosión (dph), artemia enriquecida *Metanauplii* de 8 a 30 dph y destetó una dieta comercial (Gemma Micro, Skretting, Noruega) de 20 dph en adelante. Para el enriquecimiento, el producto comercial Red Pepper se utilizó siguiendo el procedimiento de enriquecimiento proporcionado por Bernaqua (Bélgica). Cada semana, se tomaron muestras de 20-30 larvas y se anestesiaron con MS222 para estimar el crecimiento en peso y longitud. La longitud estándar se determinó mediante observación en un estereomicroscopio Nikon SMZ800 (Nikon, Japón) equipado con una cámara digital Olympus DP25 (Olympus, Alemania) y un analizador de imágenes (análisis, SIS GmbH, Alemania). Las mismas larvas se utilizaron para estimar el peso húmedo y seco, colocando las larvas en un cubreobjetos previamente pesado y después de secarlas a 60°C durante 24 h en un horno, con un microbalance Mettler Toledo MX5 (Mettler Toledo, España).

Los juveniles fueron alimentados ad libitum con una dieta comercial para lubina europea (Mar Perla, Skretting, Noruega) en 2014 y utilizando una tasa de alimentación fija en 2015 (7,5% de peso corporal para peces entre 10-30 gramos, 5% para peces de 30 -60 gramos). El crecimiento de juveniles también se registró cada 2-3 semanas durante el crecimiento y la tasa de crecimiento específica calculada según la fórmula: $SGR = (\ln W_f - \ln W_i) \times 100 / t$, donde W_f y W_i son los pesos finales e iniciales y t el tiempo (días).

Problemas observados durante la crianza, el destete y el crecimiento.- En 2014, el crecimiento larvario fue muy diferente entre las seis familias, por lo que las larvas de la primera semana crecieron más rápido y más grandes que las de la segunda semana. Los grupos C1 y V6 crecieron muy lentamente, las larvas siempre fueron muy pequeñas y el destete se volvió muy difícil porque las larvas eran demasiado pequeñas para comer el microdiet. Durante la fase de destete se detectó una alta incidencia de canibalismo que causó tasas de mortalidad muy altas y se detectó una dispersión de tamaños muy alta. Como consecuencia, el 19 de junio, cuando se llevó a cabo la primera clasificación, la supervivencia fue muy baja y se detectó una clara dispersión de pesos, con peces de 8 gy 0,4 g juntos en el mismo tanque. En 2015 intentamos evitar el canibalismo reduciendo la intensidad de la luz de los tanques, aumentando el número de dosis de alimentación (ya sea Artemia y dietas de destete durante el destete, pero también aumentando el número de dosis de microdiet después del destete) y separando las larvas pequeñas destetadas flotantes de Los grandes se distribuyen generalmente en la parte inferior de la columna de agua.

RESULTADOS

Prueba 1 (2014). Los resultados en el crecimiento (peso seco) de las larvas se muestran en la Fig. 29. El crecimiento en peso seco fue variable entre las familias obtenidas en la primera (desove del 24 de abril) y la segunda semana (desove del 1 de mayo).

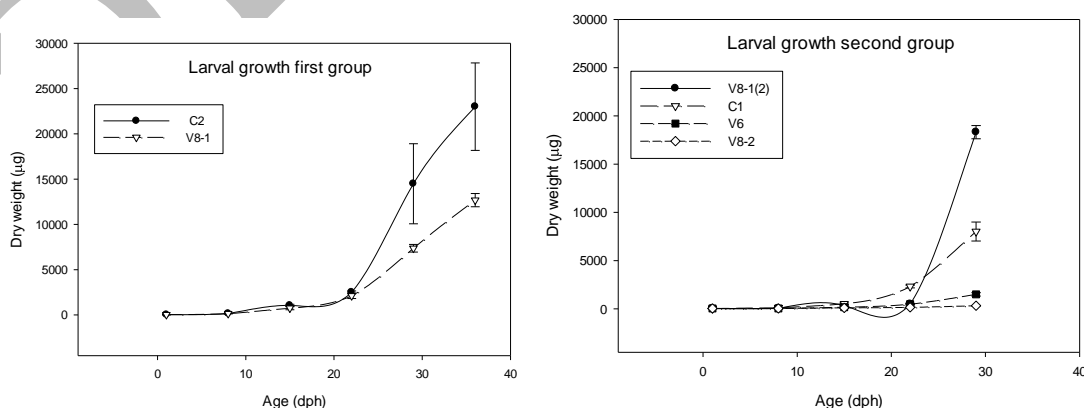


Figura 29. Crecimiento (DW, g) de los seis grupos de larvas durante el primer mes



El 19 de junio, todos los peces se clasificaron según el peso, separados en grandes (8 g para los peces del primer desove el 24 de abril y 3 g para los peces del segundo desove el 5 de mayo) y juveniles de tamaño pequeño (0,6 g del primer desove). y 0,4 g del segundo puesta, ver Tabla 16). Los resultados del número de peces clasificados se muestran en la Tabla 3 y la distribución de los tamaños de los diferentes tanques en la Fig. 2. Después de la clasificación, los peces se transfirieron al vivero. Los peces de las diferentes fechas de desove (1ª fecha 24 de abril y 2ª fecha 1º de mayo) se mantuvieron separados para dar un total de cuatro grupos en el vivero: peces grandes y pequeños de los primeros 1 desove el 24 de abril y peces grandes y pequeños de la zona de cría. 2º desove el 1 de mayo.

Tabla 16. Jóvenes grandes y pequeños transferidos a la guardería el 19 de junio.

Tanque	V8-1	C2	V8-1 (2)	C1	V6	V8-2
Grande	5	8	5	14		
Mediano	219	141	176		36	89
Total	224	181	181	14	36	89
% Supervivencia	0.64	0.43	0.52	0.04	0.10	0.25

El número y peso de los peces transferidos al vivero (tanques de 1500 l) se muestra en la Tabla 17. Los peces se almacenaron en tanques de 1500 l con > 400% de flujo a través del suministro de agua diariamente. La temperatura del agua y el fotoperíodo era natural. Los peces fueron alimentados con una dieta de corvina comercial hasta la saciedad, tanto con alimentación manual como con alimentadores automáticos.

Tabla 17. Distribución de peces en vivero el 19 de junio.

	1 st spawn	1 st spawn	2 nd spawn	2 nd spawn
	April 19 th	April 19 th	May 5 th	May 5 th
	Big	Small	Big	Small
Nº	13	360	19	212
Avg Weight (g)	8.83	0.64	2.82	0.35
SD	2.24	0.30	0.8	0.16
Biomass (g)	114.73	230.4	53.66	73.78

Una nueva clasificación de todos los peces (grandes y pequeños, ver Tabla 18) se llevó a cabo el 24 de julio para separar a los peces en 3 tamaños: peces grandes, medianos y pequeños (Tabla 18). En la nueva clasificación, las calificaciones pequeñas del 19 de junio se separaron en calificaciones medias y pequeñas para cada fecha de desove para dar un total de 6 grupos: medianas grandes y pequeñas para cada fecha de desove: 1ª generación el 24 de abril y 2ª generación el 1 de mayo (Tabla 18, fig. 30).

Tabla 18. Resultados de la segunda calificación el 24 de julio.

	Week 1			Week 2		
	Big	Medium	Small	Big	Medium	Small
Nº	12	46	168	19	49	122
Av Weight	114.54	14.14	9.22	59.59	16.60	11.01
SD	8.71	3.73	1.48	5.84	3.58	3.80
Min	50.60	11.00	5.20	23.26	12.97	5.65
Max	78.50	30.3	11.80	41.23	23.70	22.70



El 21 de agosto, todos los peces se pesaron, se midieron (longitud), se fotografiaron y se tomaron clips de aletas para el análisis genético, y además de los clips de aletas, se sacrificaron 16 peces y se almacenaron muestras de hígado y músculo en ARN. Posteriormente, para el análisis del transcriptoma (ver WP2, Tarea 2.5). Durante los primeros dos meses (del 19 de junio al 21 de agosto) en el vivero, los peces mostraron un buen crecimiento, el grupo más grande desde el primer desove (el 24 de abril) creció de 8.8 ± 2.2 ga 101.8 ± 22.3 g y el pez más grande del segundo desove (El 1 de mayo) creció de 2.8 ± 0.8 g a 56.7 ± 13.6 g (Fig. 3). Los grados pequeños y medianos de peces crecieron de 0.6 ± 0.3 g a 21.8 ± 5.0 g (grado pequeño) y de 35.2 ± 4.3 g (grado medio) para el primer desove y de 0.3 ± 0.2 ga 26.0 ± 4.1 g (grado pequeño) y hasta 50.7 ± 12.7 g (grado medio) para el segundo desove. Los peces grandes exhibieron una SGR de 5.6 y 6.9% día-1 para el primer período (junio a julio) y 1.8 y 2.1% día-1 para el segundo período (julio a agosto). Los grados medio y pequeño exhibieron un SGR de 8.0 a 10.1% día-1 para el primer período (junio a julio) y un rango de 3.1 a 4.0% día-1 para el segundo período (julio a agosto). La proporción o el porcentaje de la población que alcanzó un mayor peso fue bajo, lo que indica que algunos peces crecen más rápido que la mayoría de la población. Los grados de peces grandes representaron 3 y 8% de la población, los grados medios de 21 y 26% y los grados pequeños de 76 y 65% de la población (Fig. 30).

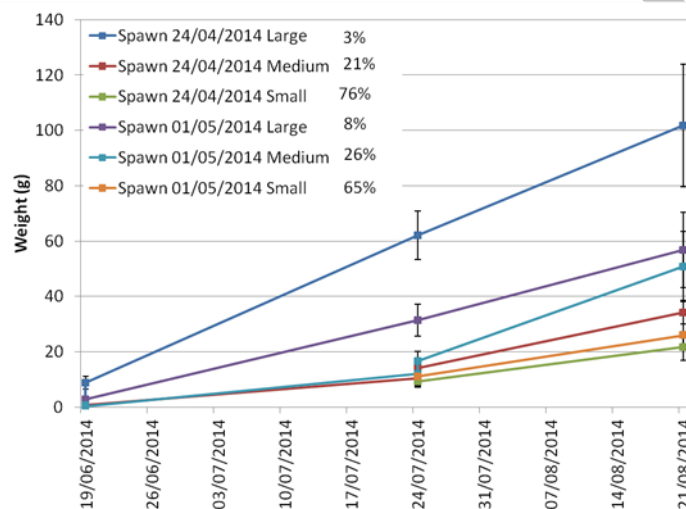


Figura 30. Crecimiento, peso húmedo promedio (g) con 1 desviación estándar de los juveniles de diferentes fechas de desove y clasificada por peso. Inicialmente, la población se dividía en peces grandes y medianos, y luego los peces medianos se dividían en medianos y pequeños. Los porcentajes en la leyenda se refieren al porcentaje de la población en cada grado.

Los peces se almacenaron en tanques de 1500 l con > 400% de flujo a través del suministro de agua diariamente. La temperatura del agua y el fotoperíodo era natural. Los peces fueron alimentados con una dieta de lubina comercial (Perla Skretting, Noruega) a saciedad, tanto con alimentación manual como con comederos automáticos. Una muestra aleatoria de 50 peces de cada grupo se pesó y midió (longitud) los días 18 de septiembre, 8 de octubre, 29 de octubre y 19 de noviembre. El rendimiento de crecimiento de estos tres grupos fue similar y la SGR en el primer período (De agosto a septiembre) fue del 2% en el día 1 en todos los grupos, del 1,6 al 1,8% en el día en todos los grupos en el segundo período (de septiembre a octubre), del 1,4 al 1,7% en el día de todos los grupos en el Tercer período (octubre) y 0.8-0.9% día-1 en todos los grupos en el cuarto período (octubre a noviembre). Los peces grandes han crecido de 27.2 ± 1.5 g a 113.9 ± 21.0 g, los peces medianos han crecido de 22.7 ± 12.2 g a 94.2 ± 19.8 g y los peces pequeños han crecido de 17.9 ± 1.8 g a 71.6 ± 21.3 g (Fig. 31) . En todas las fechas de la muestra, ha habido diferencias significativas ($P < 0.05$) entre los grados y los peces en cada grupo han crecido significativamente ($P < 0.05$). Los grados de diferente tamaño parecen tener un



potencial de crecimiento muy similar, pero los grados grande y medio siempre presentaron el mismo crecimiento ligeramente más alto que el de grado pequeño. Este sendero terminó en noviembre de 2014.

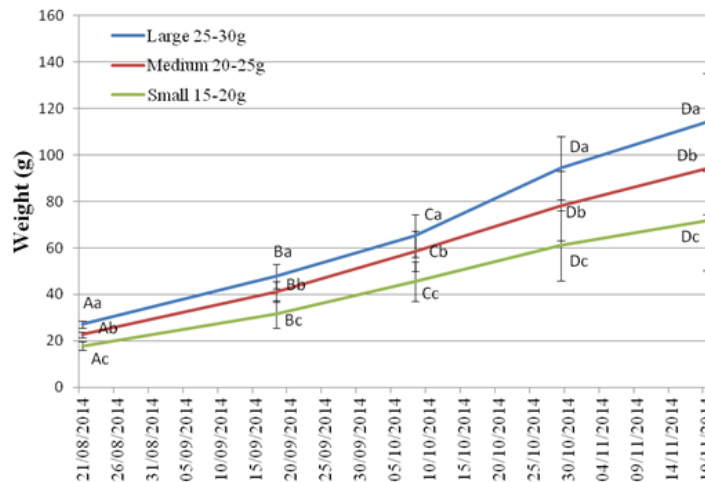


Figura 31. Crecimiento, peso húmedo promedio (g) con 1 desviación estándar de los juveniles clasificados en tres grados grande (inicialmente 25-30 g), medio (inicialmente 20-25 g) y pequeño (inicialmente 15-20 g). Estos peces representaron el 70% de la población de cinco puestas en dos fechas diferentes. Las letras mayúsculas representan diferencias significativas ($P < 0.05$) entre las fechas de la muestra para la misma calificación de tamaño. Las letras minúsculas representan diferencias significativas ($P < 0.05$) entre las calificaciones de tamaño en la misma fecha de muestra.

Los resultados obtenidos en 2014 también se resumen en la Tabla 19 y la Fig. 32, incluidas las fechas de clasificación, la edad del pez (días después de la eclosión), el peso y la tasa de crecimiento (SGR).

Tabla 19. Resumen de los resultados obtenidos en el crecimiento en peso de juveniles 2014

		2014																						
		53 dph		88 dph		116 dph		144 dph		164 dph		185 dph		205 dph		227 dph								
		19/06/2014	24/07/2014	SGR	21/08/2014	SGR	18/09/2014	SGR	08/10/2014	SGR	29/10/2014	SGR	19/11/2014	SGR	11/12/2014	SGR								
S		0,43	0,37	9,42	1,82	2,27	17,855	1,786	2,80	31,488	6,052	3,35	45,55	8,57	3,65	61,01	15,14	4,04	71,58	21,31	4,07	79,47	24,40	4,18
M				15,47	3,91		22,682	1,288	3,02	41,214	4,488	3,61	58,59	8,55	3,88	78,13	14,81	4,28	94,18	19,79	4,33	101,33	23,48	4,41
L		5,26	3,36	43,23	16,7	3,72	27,184	1,544	3,17	47,768	5,311	3,75	65,26	9,06	3,99	94,39	13,46	4,47	113,93	21,00	4,51	125,55	26,49	4,62

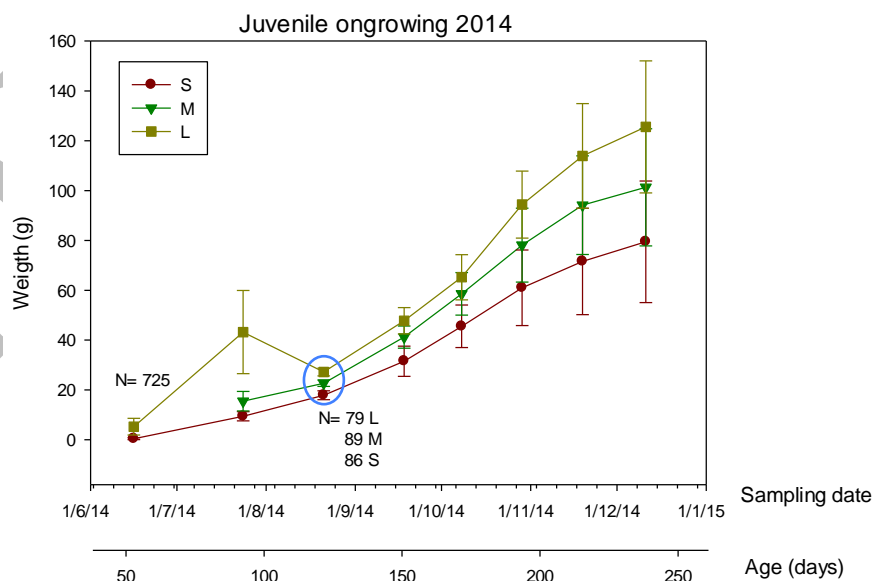


Figura 32. Crecimiento en peso de los juveniles obtenidos en 2014 después de la clasificación en pequeña (S), mediana (M) y grande (L)



Prueba 2 (2015).- Todas las larvas obtenidas de los 4 puestas se criaron mezcladas en 4 tanques. El 2 de julio, se pesaron 150 peces individualmente para verificar la distribución del tamaño antes de separarlos en individuos pequeños, medianos y grandes. El 17 de julio, todos los peces se contaron y clasificaron en peces grandes, medianos y pequeños y se distribuyeron en dos módulos RAS de acuerdo con la Tabla 20.

Tabla 20. Distribución de peces en tanques en crecimiento el 17 de julio de 2015.

14/07/2015									
Mod 5						Mod 3			
Tank 1		Tank 2		Tank 3		Tank 1		Tank 2	
N	Average WW (g)	N	Average WW (g)	N	Average WW (g)	N	Average WW (g)	N	Average WW (g)
551	0,26	802	0,43	361	1,20	660	0,44	650	0,43
Biomass (g)		343,72		433,94		291,90		278,57	
7,5% feeding rate (g)		25,78		32,55		21,89		20,89	

Los peces se mantuvieron en estos tanques (se realizó un movimiento adicional en agosto para redistribuir peces de tamaño M y reducir la biomasa en el tanque 2 Mod 5 y los tanques 1 y 2 Mod 3) durante 2 meses y se alimentaron con comederos automáticos a la velocidad de alimentación de 7.5% desde el 17 de julio hasta el 3 de septiembre, cuando los peces se clasificaron nuevamente en clips de peces grandes y medianos (L 28-32 g), medianos (M, 19-24 g) y pequeños (S, 12-16 g) tomados para los padres asignación. Los peces se clasificaron en L, M y S, y se distribuyeron en tanques por triplicado, cada uno con 100 peces que también fueron alimentados con comederos automáticos a una tasa de alimentación del 7,5% para peces entre 12 y 30 gramos y un 5% para peces que pesaban más de 30 g . Cada 2-3 semanas hasta el 5 de noviembre de 2015, los peces se pesaron para construir la curva de crecimiento y calcular la tasa de crecimiento estándar como en 2014. Los resultados se resumen en la Tabla 21 y la Fig. 33.

Tabla 21. Resumen de los resultados obtenidos en el crecimiento en peso de los juveniles 2015

2015																				
49 dph		83 dph			110 dph			112 dph			134 dph		155 dph		190 dph					
02/07/2015	05/08/2015	SGR	01/09/2015	SGR	03/09/2015	SGR	25/09/2015	SGR	16/10/2015	SGR	05/11/2015	SGR								
S	0,263	0,030	4,806	1,20	1,61	17,841	5,646	2,82	13,96	1,39	1,20	19,07	2,79	2,83	26,13	4,04	3,12	29,89	5,31	3,30
M	0,434	0,093	7,030	1,83	1,97	22,171	5,776	3,03	21,50	1,47	1,52	30,43	3,53	3,28	38,61	6,13	3,49	45,83	8,79	3,72
L	1,202	0,494	12,359	5,69	2,51	37,950	14,961	3,54	29,18	1,56	1,56	39,76	5,40	3,53	55,12	8,40	3,83	66,62	11,88	4,08

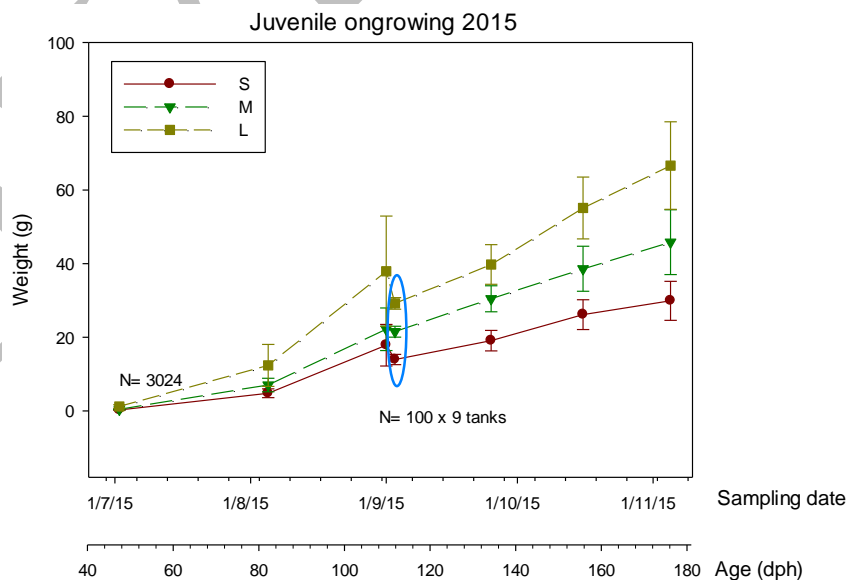


Figura 33. Crecimiento en peso de los juveniles obtenidos en 2014 después de la calificación en pequeña (S), mediana (M) y grande (L)



Con los resultados obtenidos, hemos calculado las curvas de crecimiento para 2014 y 2015 para los peces S, M y L y hemos calculado las diferencias en el crecimiento para los diferentes grupos de peces. Los resultados se presentan en la Tabla 22 y muestran claramente que los peces S siempre crecen más lentamente que los peces M y L y no hay un crecimiento compensatorio cuando los peces se clasifican en diferentes tamaños. Por lo tanto, si los peces S se mantienen en la piscifactoría, tendrán un retraso de alrededor de 6 meses para alcanzar el mismo tamaño de L peces. Aunque el crecimiento de los peces fue diferente entre los dos años (2014 y 2015), las diferencias en el crecimiento de los peces S contra L fueron casi iguales.

Tabla 22. Crecimiento teórico de los peces S, M y L en 2014 y 2015

Growth of fish in 2014			
	S	M	L
100 d	7,82	10,84	15,67
200 d	66,67	85,94	104,18
360 d	160,83	206,10	261,79
540 d	266,76	341,28	439,11
Growth of fish in 2015			
	S	M	L
100 d	12,27	19,26	24,24
200 d	33,17	50,33	73,33
360 d	66,61	100,04	151,87
540 d	104,23	155,97	240,24

Hemos observado que en corvina no hay crecimiento compensatorio cuando los peces se clasifican en tamaños durante el crecimiento. Los peces de crecimiento lento (S) siempre muestran una tasa de crecimiento más baja que los peces de crecimiento medio o rápido (L) que tienen como consecuencia un retraso de alrededor de 6 meses para obtener el tamaño comercial con claras consecuencias económicas para los productores (Tabla 23). Los precios utilizados se obtuvieron de un productor de piensos (Skretting) y del mercado central de Madrid, España.

Tabla 23. Coste de producción del pescado de cultivo L y S

COSTE DE PRODUCCIÓN DEL PESCADO QUE CRECE EN L Y S (1000 juveniles)		
	L- fish	S- fish
Juveniles (0.6€/unid)	600	600
Alimento 10-30 g (2.4€/Kg)	90	136,8
30-250 g (2.04€/Kg)	1526	2557,7
250-500 g	1943,1	3243,6
Total	4159,1	6538,1
Precio de Mercado (9,3€/Kg)	4650	4650



CONCLUSIONES

- 1.- Existe variabilidad de tamaño y diferente tasa de crecimiento en juveniles de corvina y parece tener un origen genético (la asignación de los padres todavía está en progreso)
- 2.- No hay crecimiento compensatorio de los juveniles de pequeño tamaño cuando se califican y se transfieren a tanques nuevos y se les ofrece suficiente comida.
- 3.- Después de la clasificación, los peces grandes siempre muestran una mayor tasa de crecimiento que se mantiene a lo largo del período de crecimiento. Por el contrario, los peces de crecimiento lento siempre muestran una tasa de crecimiento más baja que se mantiene durante todo el período de crecimiento, causando un retraso de aprox. 6 meses en logro de tamaño comercial.
- 4.- Nuestra recomendación para los productores de criaderos es eliminar y eliminar los peces de crecimiento lento de la cadena de producción antes de transferirlos a las instalaciones de cultivo.



DIVERSIFY



El efecto de la profundidad de la jaula y la intensidad de la luz sobre el crecimiento.

(Dirigido por HCMR, Nikos Papandroulakis)

Los objetivos de este trabajo fueron las adaptaciones en las metodologías existentes para crecer en jaulas relacionadas con el entorno de crianza (condiciones de profundidad y luz). Se implementaron dos ensayos para estudiar el efecto de la profundidad de la jaula y el efecto de la intensidad de la luz en las jaulas.

Para la profundidad de la jaula, los ensayos se realizaron en jaulas de 180 (6x6x5) y 290 (6x6x8) m³ en la granja piloto de HCMR utilizando peces pertenecientes a dos grupos de tamaños de (200-600 g) y (800- 1.5 kg).

Para el primer ensayo, se crearon cuatro grupos, dos de ~ 5,150 para las jaulas de 180 m³ y dos de ~ 8,240 para las jaulas de 290 m³ con el fin de mantener densidades de población similares para las dos condiciones. El peso húmedo al comienzo del ensayo fue de 200 ± 20 g. Para el segundo, se crearon 4 grupos, dos de ~ 2,000 individuos para las jaulas de 180 m³ y dos con ~ 3,200 para los de 290 m³. El peso inicial al inicio del ensayo fue de 867 ± 18 g.

La duración de cada ensayo fue de 8 meses. La alimentación se realizó con alimentaciones automáticas y el rendimiento de crecimiento se estimó con muestras mensuales. Cada dos meses se realizó una evaluación hematológica (hematocrito, hemoglobina), bioquímica (presión osmótica, glucosa, ácido láctico, ácidos grasos libres), inmunológica (lisozima, mieloperoxidasa sérica), hormonal (cortisol). Además, la distribución vertical en jaulas se monitorizó utilizando un integrador de eco.

Para estudiar el efecto de la intensidad de la luz en la jaula, la crianza se realizó con y sin sombreado en una granja de pymes (ARGO) aplicando procedimientos comerciales estándar. La crianza fue por 2 periodos de crianza (cada uno con 2 jaulas).

Se utilizaron dos jaulas rectangulares de 10x10x8 m ($V = 800$ m³) para cada ensayo. Uno de ellos se cubrió con una red de sombreado de 90-95% (Fig. 34), mientras que el segundo se cubrió solo con una red de protección de aves.



Figura 34. Jaulas experimentales en ARGOSARONIKOS SA. Sombreado (a) y no sombreado (b).

El primer ensayo comenzó con grupos de 11,000 individuos cada uno con un peso individual de 135 ± 25 g. Para el segundo ensayo, los grupos de peces iniciales fueron 10.940 y 10.200 en cada jaula. El peso inicial fue de 270 y 240 g respectivamente. La duración de cada prueba fue mínima de 8 meses. Los grupos se alimentaron manualmente, 3 veces al día, con dietas comerciales estándar. Se tomaron muestras regularmente para estimar la tasa de crecimiento, mientras que se monitorizó la distribución vertical en jaulas.

Efecto de la profundidad de la jaula. El rendimiento de crecimiento (Fig. 35) observado en las dos fases experimentales (200 gy 800 g de pescado) fue sin diferencias entre las condiciones probadas. Durante la primera fase, la tasa de crecimiento fue de ~ 2 g d⁻¹, mientras que para la segunda fase se incrementó a 3.5 g d⁻¹.

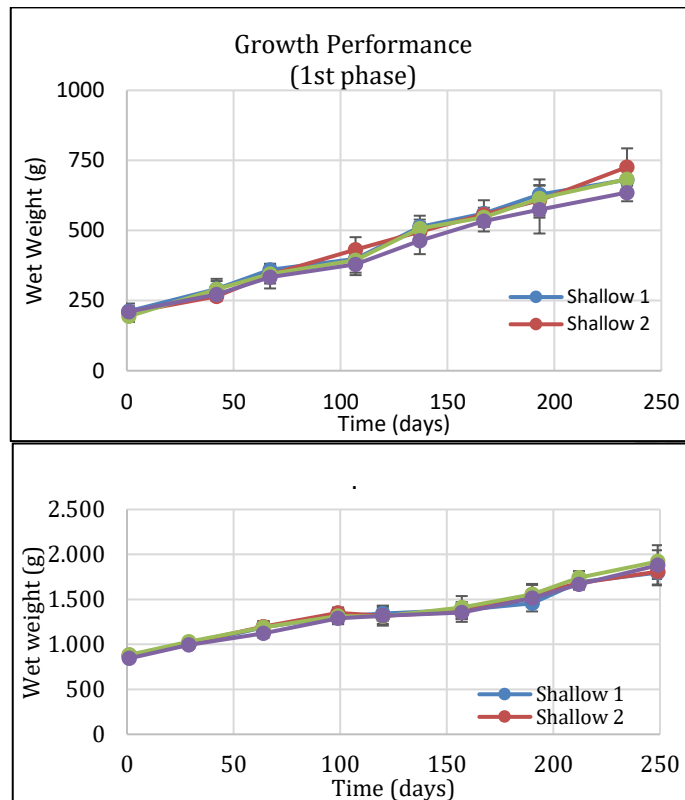


Figura 35. Desempeño del crecimiento en términos de peso promedio, de corvina. Las barras verticales muestran la desviación estándar (n = 10)

Con respecto a otros indicadores de desempeño, la Tabla 24 muestra la mortalidad (%) y el índice de conversión de alimentos (FCR). Se obtuvieron diferencias significativas solo durante el primer período con los grupos criados en las jaulas profundas (D1 y D2) que muestran casi la mitad de la tasa de mortalidad y también un FCR un 25% menor en comparación con los grupos poco profundos (S1 y S2).

Tabla 24. Indicadores de rendimiento durante las dos fases experimentales.

		S1	S2	D1	D2
1st phase	Mortality (%)	23,5	24,2	12,1	13,9
	FCR	1,92	1,92	1,58	1,60
2nd phase	Mortality (%)	10.8	9.7	7.9	8.1
	FCR	1.67	1.70	1.50	1.47

Con respecto al estado fisiológico, durante la 1^a Fase, la glucosa y el lactato (Fig. 36) mostraron diferencias entre las dos profundidades, pero las interacciones estadísticas dificultan la interpretación

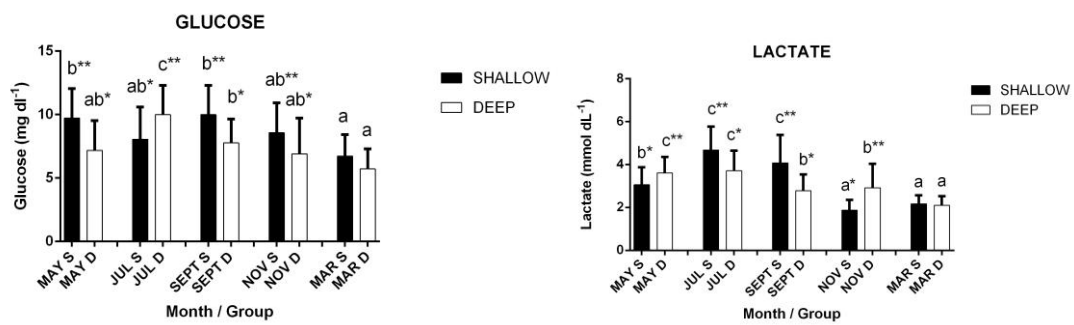


Figura 36. Niveles plasmáticos de glucosa y lactato durante el período comprendido entre mayo de 2014 y marzo de 2015. Las letras indican diferencias entre los diferentes muestreos (meses), mientras que asteriscos muestran diferencias entre las diferentes jaulas, $p < 0,05$.

Los niveles de cortisol en plasma (Fig. 37) presentaron solo fluctuaciones estacionales. Los niveles más altos observados en marzo pueden reflejar estrés debido al hacinamiento o a una temperatura más baja.

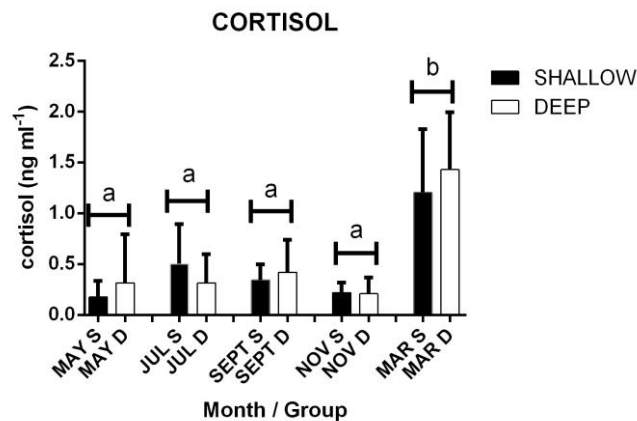


Figura 37. Niveles de cortisol en plasma durante el período de mayo de 2014 a marzo de 2015. Los valores se dan como media \pm S.D. ($n = 10$ por grupo y mes de muestreo). Las letras indican diferencias entre los diferentes muestreos (meses), mientras que asteriscos difieren entre las diferentes jaulas, $P < 0.05$.

Durante la 2ª fase, los niveles plasmáticos de cortisol y lactato (Fig. 38) presentaron valores estadísticamente significativos más altos en los peces criados en la red SHALLOW que en la red PROFUNDA al final del ensayo.

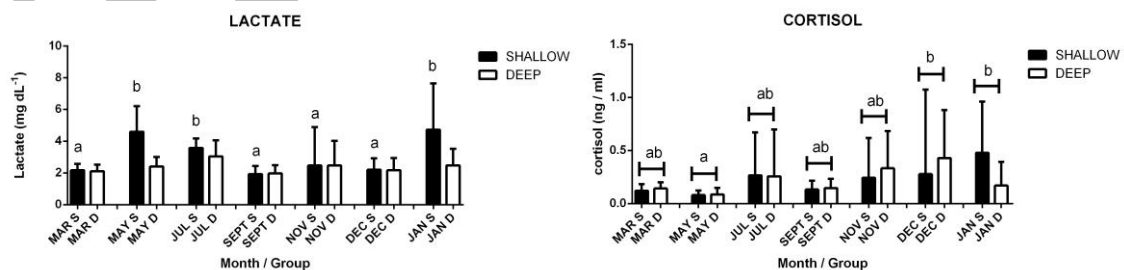


Figura 38. Niveles de cortisol en lactato y plasma durante el período de marzo de 2015 a enero de 2016. Los valores se dan como media \pm S.D. ($n = 10$ por grupo y mes de muestreo). Las letras indican diferencias entre los diferentes muestreos (meses), $P < 0.05$.

A partir de los parámetros inmunológicos medidos, se dispone de una primera estimación del estado inmunitario innato de la corvina. En comparación con otras especies mediterráneas, la actividad de la



lisozima (Fig. 39) fue doble en corvina que en la lubina europea y 6 veces más fuerte que en la dorada de Gilthead, pero 5 veces menor que en el tambor shi.

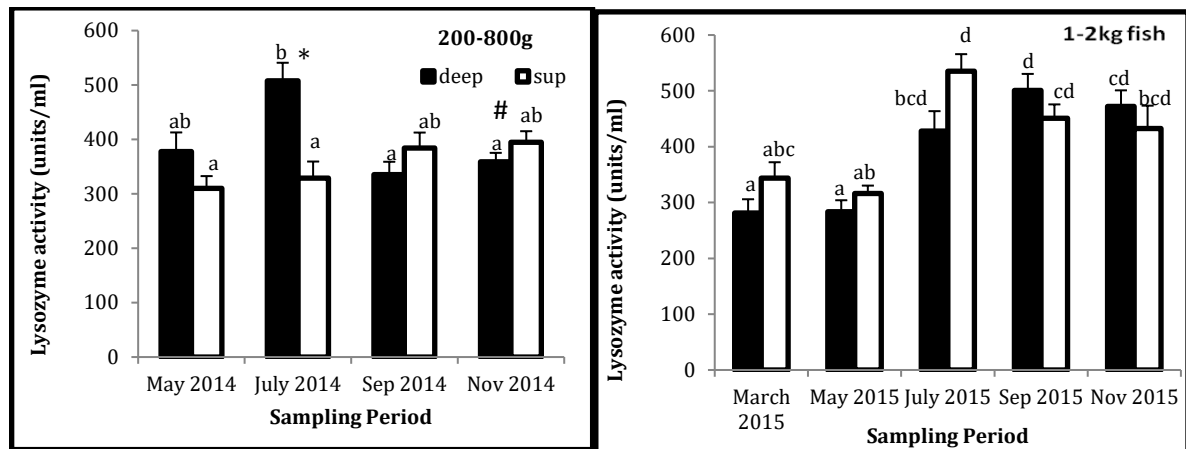


Figura 39. Actividad antibacteriana de lisozima en suero de peces pequeños (200-800 g) y grandes (1-2 kg) mantenidos en jaulas a diferentes profundidades (profunda o superficial). Los asteriscos * muestran diferencias significativas entre los diferentes tiempos de muestreo. El hashtag # muestra una diferencia significativa entre las 2 profundidades. Diferentes letras muestran diferencias significativas entre las profundidades en diferentes tiempos de muestreo (ANOVA de una vía, $P < 0.05$, prueba de Student-Newman-Keuls't). $n = 10$.

La actividad de la mieloperoxidasa (Fig. 40) también fue muy fuerte en la corvina.

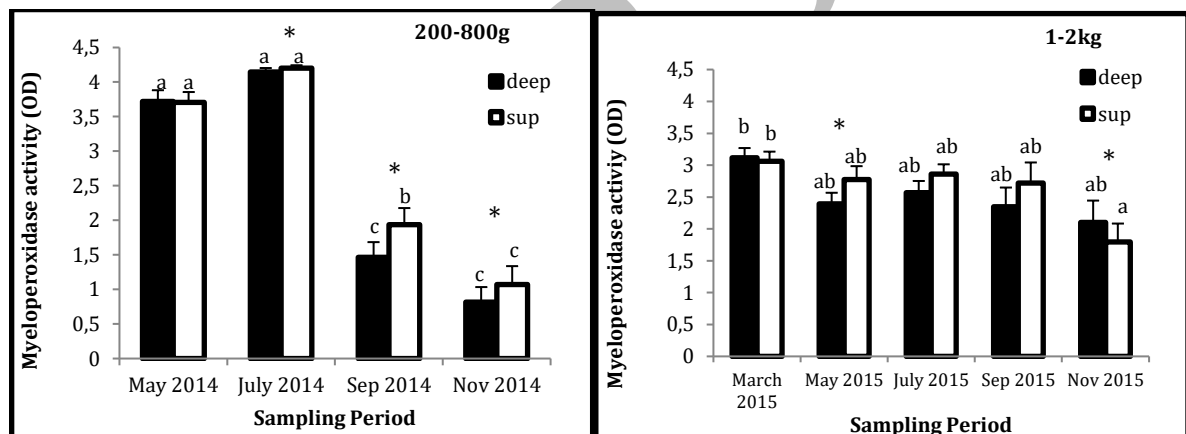


Figura 40. Actividad de mieloperoxidasa sérica de peces pequeños (200-800 g) y grandes (1-2 kg) mantenidos en jaulas a diferentes profundidades (profundas o poco profundas). Los asteriscos * muestran diferencias significativas entre los diferentes tiempos de muestreo. El hashtag # muestra una diferencia significativa entre las 2 profundidades. Diferentes letras muestran diferencias significativas entre las profundidades en diferentes tiempos de muestreo (ANOVA de una vía, $P < 0.05$, prueba de Student-Newman-Keuls't). $n = 10$.

La comparación entre peces pequeños y grandes mostró que los peces pequeños tienen un arsenal fuerte contra las infecciones bacterianas (tanto Gram positivas como negativas). La profundidad de la jaula afectó significativamente a la lisozima y complementó la actividad antibacteriana (Fig. 41) de peces pequeños de manera opuesta, lo que hace imposible dar una recomendación sobre la profundidad óptima de la jaula. La profundidad de la jaula no está significativamente involucrada en el estado de salud de los peces grandes. Las variaciones estacionales (temperatura del agua y fotoperíodo) tuvieron un efecto más fuerte en los parámetros inmunitarios de los peces probados que la profundidad de las jaulas

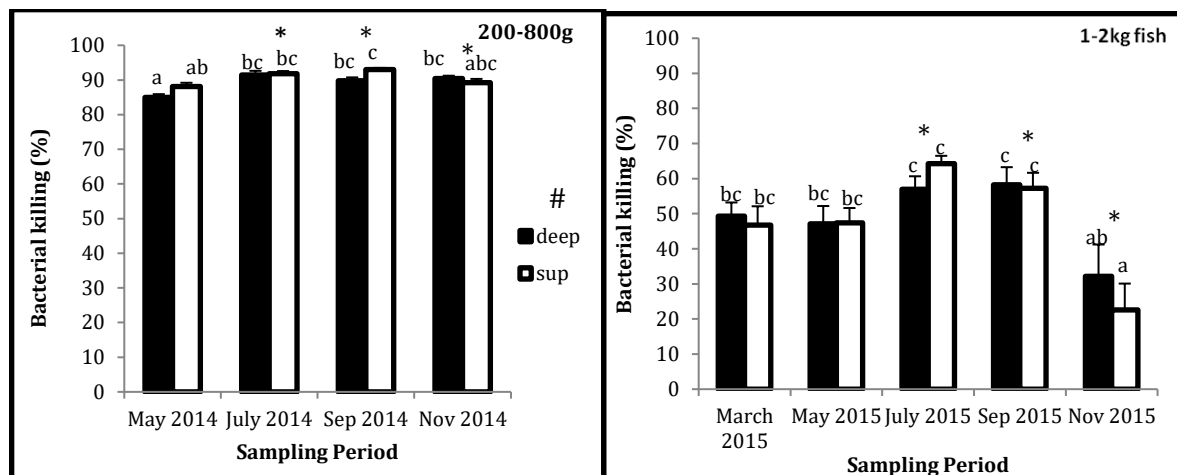


Figura 41. Actividad antibacteriana del complemento sérico de peces pequeños (200-800g) y grandes (1-2kg) mantenidos en jaulas a diferentes profundidades (profundas o superficiales). Los asteriscos * muestran diferencias significativas entre los diferentes tiempos de muestreo. El hashtag # muestra una diferencia significativa entre las 2 profundidades. Diferentes letras muestran diferencias significativas entre las profundidades en diferentes tiempos de muestreo (ANOVA de una vía, $P < 0.05$, prueba de Student-Newman-Keuls't). $n = 10$.

Con respecto al monitoreo del comportamiento, se analizaron todos los datos recopilados y no se observó ninguna alteración significativa dentro ni entre los grupos experimentales. El comportamiento esperado durante el día fue evidente en todos los casos, con la mayoría de los individuos concentrados en las capas inferiores de la jaula y con los movimientos observados hacia la superficie cuando ocurrió la alimentación.

Por lo tanto, la distribución vertical de la corvina fue mayoritariamente en la mitad inferior de la jaula durante un período de aproximadamente 12 horas, mientras que el resto del período la corvina se distribuyó casi homogénea en todo el volumen disponible de la jaula (Fig. 42).

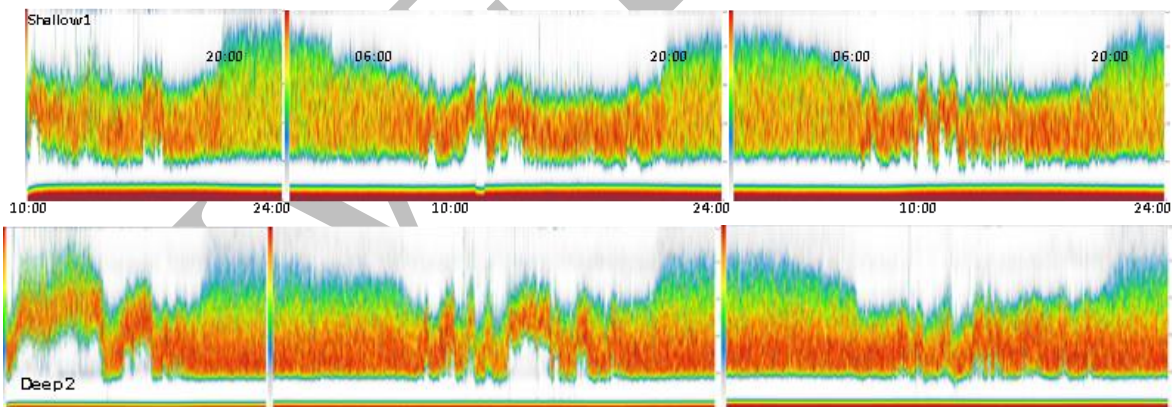


Figura 42. Distribución vertical de corvina en las jaulas experimentales por un período de 3 días.

El único período en el que los peces parecían estar en estrés fue durante el período de alta temperatura de finales de agosto a septiembre, cuando los individuos con peso corporal ~ 1,5 Kg eran lentos y con poco apetito. Este no fue el caso de los grupos más jóvenes (peso de aprox. 500 g).

Este comportamiento es, en general, diferente de lo que se observó en el salmón o la lubina europea criada en jaulas. La corvina en general aparece como una especie con alta tolerancia a condiciones variables y con un patrón de comportamiento muy conservador. El comportamiento nocturno observado que, por lo que sabemos, se observó por primera vez, puede representar un período potencial de cría alternativo para la especie, es decir, un período en el que la especie puede recibir una hipótesis de prueba y los resultados se presentan en la siguiente sección.



Efecto de la intensidad luminosa en la jaula.

El rendimiento de crecimiento no presentó diferencias entre las condiciones probadas (Fig. 43) Durante el primer ensayo, la tasa de crecimiento fue de 1.2 g d⁻¹ para los peces en la jaula sombreada, mientras que fue de 1.3 para el segundo grupo. Durante el segundo ensayo, ambos grupos se desempeñaron significativamente mejor que el primer ensayo, pero nuevamente no se observaron diferencias entre las condiciones experimentales. Las tasas de crecimiento fueron 1.64 g d⁻¹ y 1.68 g d⁻¹ para los peces en la jaula sombreada y la jaula sin sombra, respectivamente.

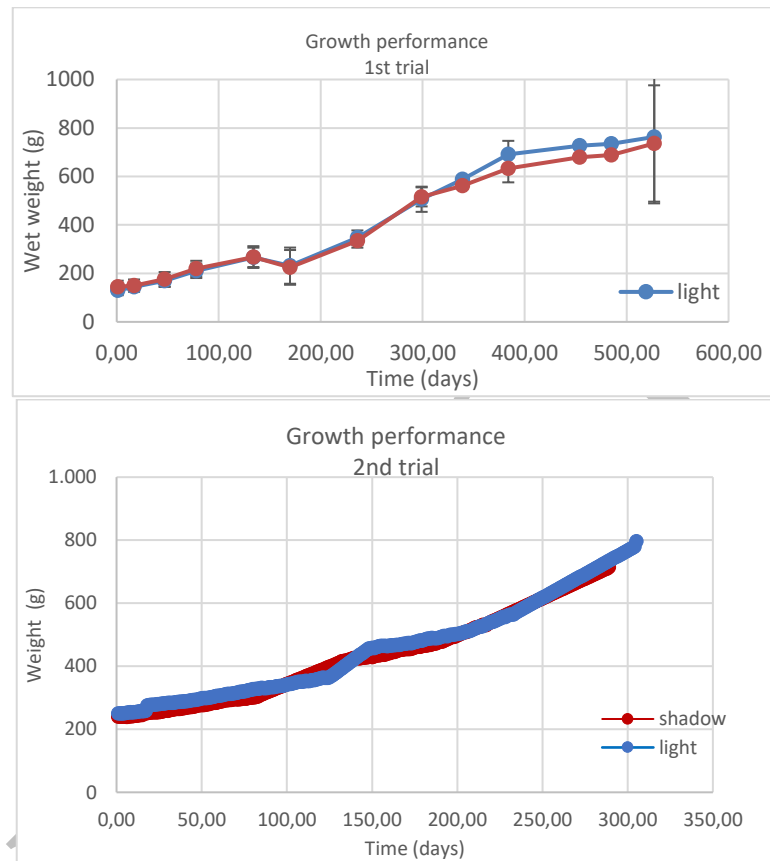


Figura 43. Desempeño del crecimiento de los grupos experimentales. Las barras verticales muestran la desviación estándar de la media.

Algunos índices adicionales para el rendimiento biológico de los grupos se presentan en la Tabla 25.

Tabla 25. Parámetros de rendimiento de los grupos experimentales.

	Trial 1		Trial 2	
	Shadow	Light	Shadow	Light
FCR_{econ}	3.0	2.9	2.0	1.8
Survival (%)	91.4	92.7	98.3	93.3
Final Body Weight (g)	825.8±240.1	910.6±274.0	714.3±169.8	796.5±181.9
Variation Coef. (%)	29.1	30.1	23.8	22.8

La variación de tamaño fue mayor en el primer ensayo, mientras que hubo una variabilidad casi similar entre las condiciones experimentales.



Los resultados mostraron que en el primer experimento, y solo en la primera fase de la crianza, el rendimiento de los peces en jaulas profundas fue mejor, basado principalmente en los resultados de la mortalidad y la Relación de conversión de alimentos (FCR), mientras que para el otro los parámetros probados, no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre las profundidades y solo se detectaron diferencias estacionales. Específicamente, tanto el FCR como la tasa de mortalidad tuvieron mejores valores en jaulas con redes netas profundas. Para la 2ª fase de la crianza no se observó diferencia entre las condiciones probadas. Lo mismo vale también para el experimento de sombreado.

Desarrollo de metodología de alimentación.

(Liderado por HCMR, Nikos Papandroulakis)

Para el desarrollo de una metodología de alimentación apropiada se implementaron los siguientes pasos. El primer paso fue probar en tanques si la corvina responde a diferentes estímulos de alimentación (mecánicos, ópticos, etc.) y también probar diferentes métodos de alimentación. Para esto, se utilizaron grupos de dos tamaños individuales diferentes (50-100 y 700-900 g) a diferentes tamaños de tanque (500 y 5000 l respectivamente) para probar los estímulos de alimentación óptica y mecánica durante un período de 4 meses (cada grupo). El monitoreo con grabaciones de video permitió la definición de los estímulos de alimentación óptimos. Se probaron tres métodos con peces de dos edades diferentes (50-100 y 700-900 g) a diferentes tamaños de tanques (500 y 5000 l) durante un período de 4 meses (cada grupo). Los métodos probados fueron: (i) auto alimentador, (ii) alimentación automática tres veces al día y (iii) alimentación manual. Se realizó monitoreo con grabaciones de video y registros de la actividad de autoalimentación. El segundo paso fue probar en jaulas diferentes periodos de alimentación relacionados con la presencia de luz (día-noche) y también diferentes métodos de distribución de alimento. Para esto se implementó un experimento para probar el rendimiento de la corvina en jaulas cuando se alimentaba exclusivamente durante el día o durante la noche. En un segundo experimento se comparó la distribución de alimento desde la superficie y desde el fondo. Las pruebas se realizaron durante dos ensayos duplicados en la granja piloto de HCMR en jaulas (6x6x8 m3). Se utilizó un grupo de talla por un período de 8 meses para cada ensayo. El rendimiento del crecimiento se estimó con muestras mensuales, mientras que cada dos meses se realizó una evaluación hematológica, bioquímica, inmunológica y hormonal. Además, la distribución vertical en jaulas se controlará mediante un integrador de eco. El tercer paso fue la comparación de la alimentación automática y del tipo de demanda en tanques para un ciclo de producción. Comparación en cada estación del año de (a) alimentación de demanda y (b) alimentación con alimentadores automáticos programados para seguir las rutinas de alimentación que se utilizan habitualmente en las granjas de jaulas de corvina (la alimentación en granjas ahora se basa principalmente en la alimentación automática). Se compararán tres tanques de control duplicados (alimentación automática) con tres tanques experimentales de alimentación a demanda. Se instalarán cámaras de video y sensores para registrar la actividad de los peces y los comportamientos relacionados con la alimentación y la agresión. Las condiciones experimentales serán el fotoperíodo natural y la temperatura natural simulada controlada para que sea similar a las áreas de cultivo en jaulas marinas para la temporada específica. Los parámetros que se evaluaron fueron el tiempo de alimentación, el alimento suministrado, el crecimiento, la variación de tamaño en la población, el FCR, el patrón de actividad de los peces, el nivel de comportamiento agresivo y la condición de la aleta. Todos estos pasos proporcionaron información suficiente para proponer una Metodología para la alimentación de corvina.

El efecto de diversos estímulos en el comportamiento alimentario.

(Liderado por HCMR, Ioannis Papadakis)

Tres experimentos consecutivos se llevaron a cabo en las instalaciones de HCMR, en Creta, Grecia. Los dos primeros se realizaron en interiores con individuos que oscilaron entre 50 y 100 g en peso corporal, mientras que el tercero se realizó en exteriores con individuos que oscilaron entre 600 y 900 g.



Para los peces pequeños, se utilizaron cuatro grupos experimentales relacionados con el estímulo utilizado. Para el primer grupo, llamado "Luz", el estímulo era una luz que se apagaba, proveniente de lámparas LED impermeables que se colocaron en la columna de agua a 10 cm por debajo de la superficie del agua debajo del alimentador utilizado. Para el segundo grupo, llamado "Aire", el estímulo fue una burbuja de aire liberada de un tubo de plástico de 5 mm que se colocó en la misma posición que antes del alimentador. Para el tercer grupo, llamado "Aire y Luz", se utilizó una combinación de los estímulos anteriores, "pero los estímulos de" Luz "se realizaron durante la mañana y la tarde, mientras que los estímulos de" Aire "durante el mediodía. El cuarto grupo experimental fue el grupo control sin estímulos antes de la alimentación. Para controlar el comportamiento del pez, se colocó una cámara de grabación sobre cada tanque (Fig. 44).

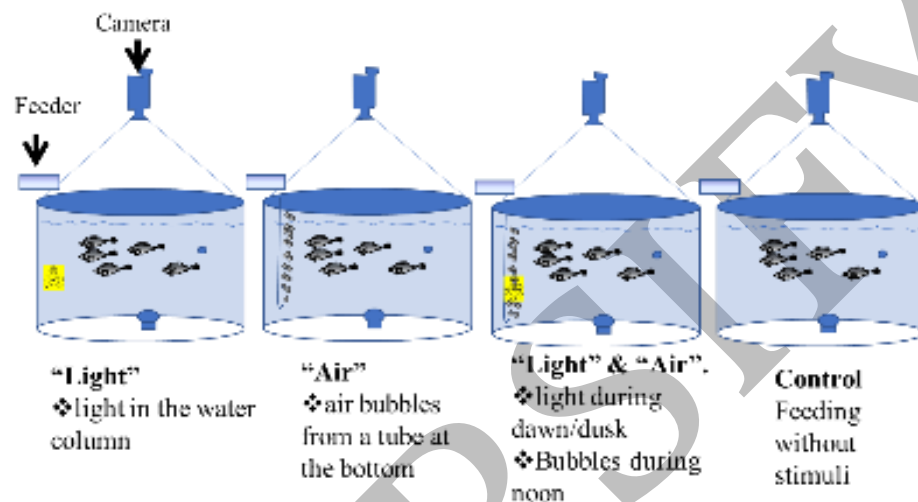


Figura 44. Una representación esquemática de los tanques experimentales con los diferentes tipos de estímulos.

Sobre la base de los resultados de los experimentos con peces pequeños, se crearon tres grupos experimentales de peces grandes (600-900 g). Para la primera, llamada "Luz", el estímulo era una luz que se desvanecía, de una cinta impermeable de LED, colocada en la columna de agua a 10 cm por debajo de la superficie del agua debajo del alimentador utilizado. La intensidad de luz máxima de las lámparas, tal como se midió desde una distancia de 40 cm, osciló entre 350-400 lx. La intensidad de la luz natural al mediodía con sol tuvo un valor de 24,000 lx a 34,000 lx. Para el segundo grupo, llamado "Aire", el estímulo eran burbujas de aire liberadas de un tubo de plástico de 5 mm colocado en la misma posición en la columna de agua que el estímulo de luz. El tercer grupo experimental fue el grupo control sin estímulos antes de la alimentación.

Del total de 60 días experimentales, se seleccionaron 14 días para el análisis, uno cada 4 días. Siguiendo procedimientos similares a los presentados en los experimentos anteriores, de cada video de 5 minutos, se



extrajeron y analizaron 70 imágenes y se determinaron las coordenadas de cada pez (la cabeza) en el tanque. En particular, cada tanque se dividió en seis áreas cuadradas iguales (Fig. 45).

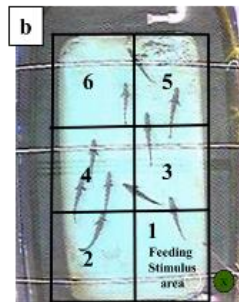


Figura 45. Representación de las diferentes áreas en que se dividieron los tanques. El área 1 incluía tanto el estímulo como el área de alimentación, mientras que el círculo verde representa la posición del alimentador.

Las burbujas de aire y la luz se aprendieron rápidamente y respondieron como estímulos de alimentación. Tanto las burbujas de aire como la luz o una combinación de ambas se pueden utilizar en un entorno industrial, ya que los sistemas para aplicar estos estímulos se pueden fabricar, implementar y gestionar fácilmente con las tecnologías existentes en las jaulas marinas. Sin embargo, las condiciones bajo las cuales se lleva a cabo la crianza se deben considerar para seleccionar el estímulo apropiado. Por lo tanto, el uso de burbujas podría incorporarse fácilmente en la crianza de corvina, mientras que el estímulo lumínico podría usarse en condiciones donde la alimentación se realiza con intensidades de luz relativamente bajas (temprano en la mañana, tarde, noche), o en casos donde en general la crianza se realiza con poca luz, por ejemplo, en tanques o jaulas cubiertas. Los estudios adicionales que utilicen diferentes estímulos serían útiles, ya que la información general sobre el comportamiento de la corvina se considera limitada. Por ejemplo, podría ser recomendable estudiar la respuesta de la corvina en otros tipos de estímulos, como los estímulos acústicos, y probar su efectividad cuando se usan como estímulos para la alimentación.

El efecto de los métodos de distribución de alimentos.

(Liderado por HCMR, Nikos Papandroulakis)

El objetivo de la prueba fue probar dos métodos de distribución de alimentación que eran de la superficie de la jaula y usando un dispositivo de distribución sumergido. El ensayo se realizó en instalaciones a escala piloto de HCMR por duplicado utilizando jaulas de 290 (6x6x8) m³ indicadas como Normal y Sumergidas. El peso corporal inicial húmedo al comienzo del ensayo fue de 290 ± 20 g. La duración del ensayo se planeó en 8 meses. Comenzó en mayo de 2017 y se completó en diciembre de 2017. La alimentación fue similar en todos los casos (proporcional a la biomasa de cada grupo) pero la distribución fue diferente según la condición analizada. La alimentación estándar con alimentadores ubicados en la superficie de la jaula se comparó con la alimentación sumergible distribuida. La alimentación sumergida se realizó transfiriendo la alimentación junto con agua de mar a través de un tubo flexible desde la superficie hasta una profundidad predefinida aproximadamente a la profundidad media de la jaula (es decir, 4 m). Una bomba eléctrica ubicada en la plataforma bombeaba agua hacia la jaula, mientras que un mecanismo de dosificación eléctrico entregaba la cantidad de alimentación requerida (Fig. 46). Durante el período experimental, el rendimiento de crecimiento se estimó con muestras mensuales. Cada dos meses se tomaron muestras de sangre para la evaluación hematológica (hematocrito, hemoglobina), bioquímica (glucosa, lactato), inmunológica (lisozima, mieloperoxidasa) y hormonal (cortisol). La distribución vertical de las poblaciones en jaulas se ha supervisado mediante un integrador de eco (CageEye 1.3, Lindem Data Acquisition AS, Noruega).



Figura 46. Alimentador instalado durante la prueba para la alimentación sumergida.

La tubería de alimentación se instaló en el centro de la jaula. Una terminación en forma de S giratoria aseguró una distribución uniforme de los gránulos (Fig. 47).



Figura 47. La terminación en forma de S del sistema de alimentación sumergido.

Durante el período experimental, la crianza se implementó sin ningún problema en particular, como patologías que podrían haber provocado cambios significativos en las condiciones experimentales. La tasa de crecimiento fue de ~ 3.8 g d⁻¹ para todas las condiciones probadas sin que se observara una diferencia significativa entre o dentro de las condiciones probadas (Fig. 48). El peso final presentó un coeficiente de variación para todos los grupos entre 20.6 y 25.7% sin diferencias entre las condiciones probadas. La distribución de tamaños al final del ensayo fue normal para todos los grupos, aunque se observó una tendencia hacia tamaños más grandes para los grupos alimentados sumergidos.

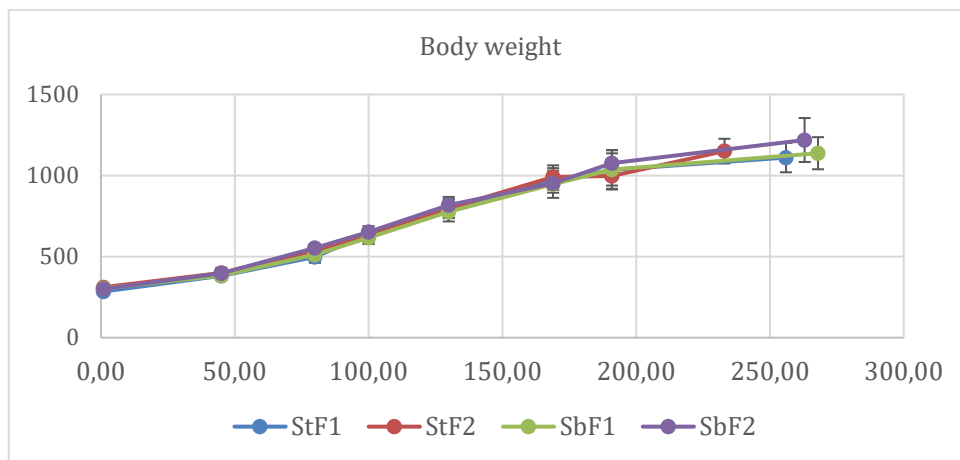


Figura 48. Desempeño del crecimiento, peso medio, de la corvina. Las barras de error son la desviación estándar (n = 10).

Con respecto al comportamiento de los peces en los diferentes grupos, en términos de su distribución vertical en la jaula, el patrón fue similar al observado en experimentos previos en la granja de jaulas de Souda (Fig. 49). Los peces se encontraban principalmente en el fondo de la jaula durante las horas diurnas del día y se extendieron en todo el volumen disponible durante la oscuridad.

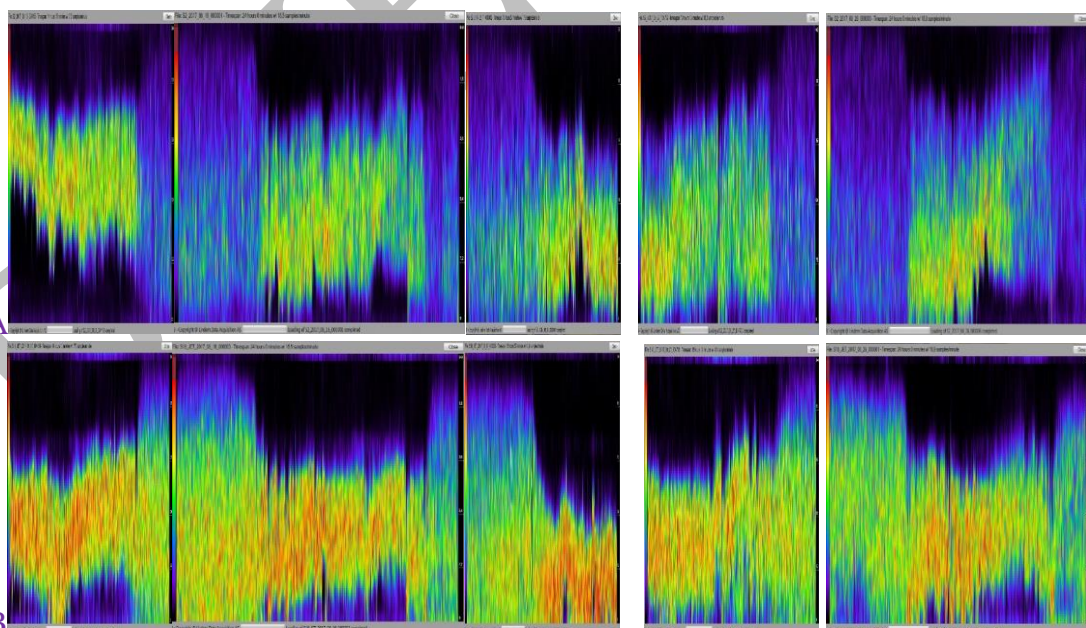


Figura 49. Ecogramas con la distribución vertical de los grupos criados en (a) Alimentación estándar y (b) Alimentación sumergida. Eje horizontal es el tiempo, mientras que Vertical es la profundidad de la jaula (de abajo hacia arriba). Diferentes colores (de violeta a rojo) representan diferentes densidades.



Comparativa de alimentación automática y de demanda en tanques.

(Liderado por IRTA, Neil Duncan y Alicia Estevez)

El experimento utilizó 1200 peces entrenados distribuidos al azar en seis tanques de 1500 L, 200 peces por tanque. Los tanques se conectaron en pares a un sistema de recirculación (IRTAMar®) (Fig. 50). A medida que los peces crecían, la biomasa se eliminaba de los tanques reduciendo el número de peces por tanque. Todos los tanques fueron equipados con una red para evitar que los peces salten del tanque. El fotoperíodo era natural y el régimen de temperatura simulaba la temperatura del agua de mar en la costa mediterránea de España, donde las corvinas se cultivan en jaulas marinas. El fotoperíodo se mantuvo con un reloj que encendía y apagaba las luces en relación con el fotoperíodo natural de la región (latitud: 40.628° de longitud: 0.665°). La iluminación diurna fue proporcionada por luces fluorescentes diurnas que proporcionaron 120 ± 12 lux en la superficie del agua. Se utilizó una iluminación con poca luz de un LED blanco cubierto con una lámina de aluminio perforada durante la noche para simular la iluminación de la luz de la luna o de la estrella. La iluminación fue suficiente para ver visualmente el contorno de las formas de los peces, pero no registró una intensidad en el medidor de lux (0 lux).



Figura 50. Configuración experimental con seis tanques conectados en pares a RAS, IRTAMar. Cada par de tanques era un régimen de alimentación programado (Prog) y un sistema de alimentación de demanda automática (AD).

El crecimiento entre los dos tratamientos fue similar (Fig. 51). Los peces en los dos sistemas de alimentación, programados y de demanda automática, crecen significativamente ($P < 0.05$) respectivamente de 58.0 ± 0.9 gy 58.5 ± 1.0 g a 340.5 ± 9.5 gy 322.1 ± 7.6 g. No hubo diferencias significativas en el peso de los grupos de los dos tratamientos durante 10 meses. Sin embargo, en dos meses los grupos de alimentación programados fueron significativamente ($P < 0.05$) más grandes que los grupos de demanda automática. En marzo de 2017, el peso medio de los peces con el sistema de alimentación programado fue de 188.2 ± 3.5 g en comparación con 171.4 ± 3.4 g con el sistema de alimentación automática y en mayo, el sistema de alimentación programada fue de 268.1 ± 5.4 g en comparación con 251.2 ± 5.9 g con el sistema de alimentación de auto-demanda. Las diferentes réplicas de los mismos tratamientos se mantuvieron en diferentes sistemas de recirculación y no hubo interacción significativa entre el efecto del tratamiento y el sistema de recirculación sobre el crecimiento. Sin embargo, el sistema de recirculación tuvo un efecto significativo en el crecimiento y en los meses de febrero, marzo, mayo y junio los peces en el sistema de recirculación 2 fueron significativamente (P



<0.05) más grandes que los otros sistemas de recirculación. No se observaron diferencias entre los sistemas de recirculación en ningún otro mes.

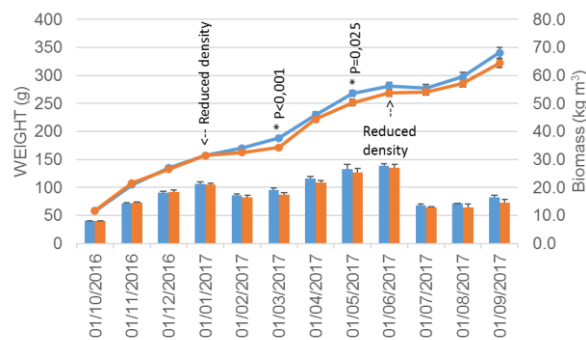


Figura 51. Crecimiento en el peso medio húmedo (líneas del eje izquierdo) y biomasa del tanque (columnas del eje derecho) de corvina (*Argyrosomus regius*) alimentado con dos sistemas de alimentación, programados (azul) y auto-demanda (marrón) (n = 180, 60). réplica de 3 tanques). Las flechas indican cuándo se redujo el número de densidad de peces. Un asterisco indica diferencias significativas entre los tratamientos de alimentación con el valor de p real.

El crecimiento de los peces en los dos sistemas de alimentación exhibió un patrón similar durante el año. No hubo diferencias significativas en la tasa de crecimiento específico (SGR) entre los peces alimentados con los dos sistemas de alimentación o entre los peces mantenidos en diferentes sistemas de recirculación. El mayor crecimiento y SGR se observó al comienzo del experimento. A medida que las temperaturas disminuyeron, la SGR disminuyó a un mínimo durante febrero y marzo. La SGR aumentó durante la primavera con el aumento de la temperatura antes de disminuir en mayo, junio y julio debido a la alta biomasa, la alteración de los números reducidos y las altas temperaturas del verano. La SGR aumentó hacia el final del juicio en agosto y septiembre.

No hubo diferencias en la FCR entre los alimentos para peces con los dos sistemas de alimentación, programados y de demanda automática. No hubo diferencias en todo el experimento y los peces con alimentación programada tuvieron una FCR media de $1,50 \pm 0,02$ y los peces con alimentación automática a demanda tuvieron $1,42 \pm 0,01$. Tampoco hubo diferencias dentro de cada mes y el alimento para peces con los dos sistemas de alimentación exhibió FCR similares que variaron desde menos de 1 durante octubre y marzo hasta un máximo de más de 3 en agosto (Fig. 52). El FCR por encima de 1.5 coincidió con los extremos de temperatura (15°C y 25°C) y / o las densidades de almacenamiento más altas $> 20 \text{ kg} / \text{m}^3$ (Fig. 52). Las reducciones en los números para reducir la densidad de población también parecieron tener un impacto negativo en la alimentación y el crecimiento, particularmente en junio.

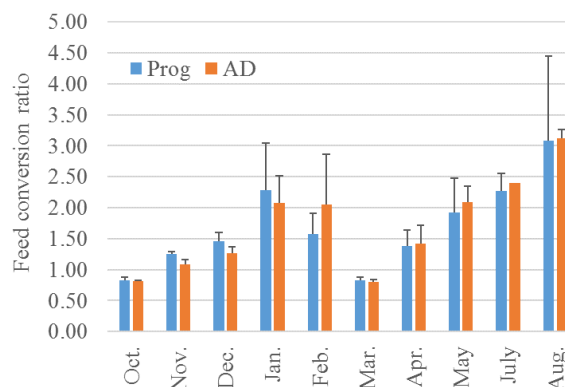


Figura 52. Relación de conversión de alimentación media (FCR) de corvina alimentada con dos sistemas de alimentación, programada (azul) y auto-demanda (marrón) (n = 3 tanques de réplica). No hubo diferencias significativas entre el sistema de alimentación (P = 0.252).



El número acumulado de demandas durante todo el experimento fue significativamente mayor durante la noche en comparación con el día (Fig. 53). Durante la noche (de 19:00 a 06:00) hubo una media de 720 ± 22 demandas / hora en comparación con el día (de 07:00 a 18:00) con una media de 439 ± 22 demandas / hora. El patrón de alimentación durante la noche pareció cambiar de la primera parte del experimento a la segunda parte del experimento. Durante el período de octubre de 2016 a abril de 2017, hubo más demanda de alimentos en la primera parte de la noche, de 19:00 a 22:00 (Fig. 47 - medio), mientras que durante el período de abril de 2017 a septiembre de 2017, el nivel más alto La demanda fue todo el período de la noche de 20:00 a 08:00 (Fig. 53 - derecha).

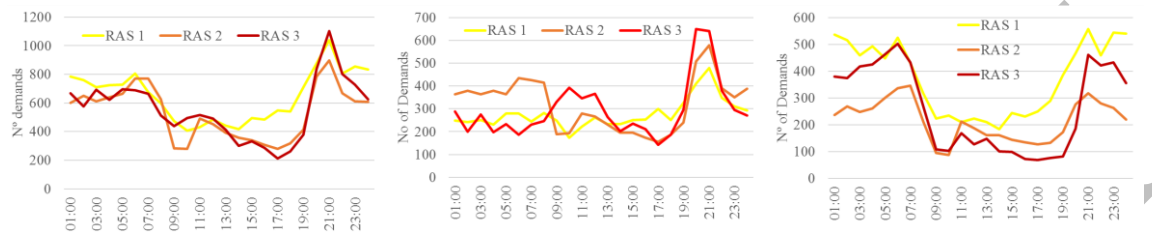


Figura 53. Cantidad acumulada de demandas durante cada hora de corvina (*Argyrosomus regius*) en tres réplicas en diferentes sistemas de recirculación, RAS 1 (amarillo), RAS 2 (naranja) y RAS 3 (rojo). Las tres cifras representan demandas durante todo el experimento (octubre de 2016 a septiembre de 2017) (izquierda), durante el período de octubre de 2016 a abril de 2017 (medio) y el período de abril de 2017 a septiembre de 2017 (derecha).

Corvina exhibió un comportamiento social no agresivo hacia los conoespecíficos y un comportamiento de alimentación oportunista durante toda la jornada de 24 horas. Los peces presentaron claramente un comportamiento nocturno, alimentando y utilizando todo el tanque desde el fondo hasta la superficie durante la noche, en comparación con el día, cuando los peces permanecieron bajos en la columna de agua. Sin embargo, el comportamiento no fue exclusivamente nocturno y los peces estuvieron activos y alimentados durante el día. El sistema de alimentación, programado o de demanda automática no tuvo un efecto significativo en el crecimiento, la variación de tamaño o el índice de conversión de alimentación (FCR). El objetivo del ensayo fue determinar los patrones de alimentación que pueden mejorar el crecimiento, la FCR y reducir la variación de tamaño. Otras especies que se alimentan con sistemas de demanda automática han mostrado un mejor crecimiento, mejor FCR, menos variación de tamaño y comportamientos menos agresivos en comparación con sistemas con tiempos de alimentación específicos. Sin embargo, la corvina no presentó un patrón de alimentación claramente definido. Durante todo el año, la cantidad acumulada de alimento consumido cada hora mostró un patrón con una alimentación elevada durante la noche en comparación con el día. Se realizó una media de 720 ± 22 demandas / hora durante la noche (19:00 a 06:00) en comparación con 439 ± 22 demandas / hora durante el día (07:00 a 18:00), lo que indicó que durante todo el año. El año 62% de la alimentación fue la demanda durante la noche y el 38% durante el día. La alimentación observada a lo largo de las 24 horas del día en comparación con las alimentaciones programadas a las 09:00 y a las 17:00, no tuvo un efecto en el crecimiento, la variación de tamaño o el FCR.

No hubo diferencias en la tasa de crecimiento (SGR), distribución de tamaño o FCR en ningún mes durante el experimento. Sin embargo, hubo una variación considerable tanto en la SGR como en la FCR entre los meses, lo que indica que factores distintos al sistema de alimentación influyeron en la SGR y la FCR en ambos sistemas de alimentación. El factor más obvio fue la temperatura y el bajo invierno de 15°C eliminó claramente el apetito y el crecimiento. Las condiciones óptimas de crecimiento fueron en octubre y marzo, con un SGR por encima de $1,5 \text{ g} / \text{ día}$ en octubre y $0,75 \text{ g} / \text{ día}$ en marzo y FCR por debajo de 1 en ambos meses. Octubre tuvo temperaturas de 23°C y densidades de almacenamiento de menos de $10 \text{ kg} / \text{ m}^3$ y Marzo tuvo temperaturas de 16°C y densidades de almacenamiento de $20 \text{ kg} / \text{ m}^3$. Sin embargo, parece que durante los meses de verano el crecimiento y la FCR se vieron influenciados negativamente. Entre los posibles factores negativos se encuentran las altas temperaturas (25°C de julio a septiembre), las densidades de siembra ($> 25 \text{ kg} / \text{ m}^3$ en mayo), el tamaño de los peces



en relación con el tamaño de los tanques y la reducción de números (enero y junio) . Parece que la densidad de población y la reducción en el número impactaron negativamente durante mayo y junio y el tamaño o la temperatura de los peces impactaron negativamente en julio y agosto. Aunque al final del experimento los pesos medios fueron de 322 a 340 g, las poblaciones sesgadas altamente positivas contenían peces de 700 a 800 g. Esta variación de tamaño es similar a la situación en el cultivo en jaula y el Entregable 20.1 demostró que los peces juveniles de crecimiento más rápido obtienen y mantienen una ventaja de crecimiento. La variación de tamaño no estuvo relacionada con el sistema de alimentación.

En general, el sistema de alimentación no afectó el comportamiento de la corvina. Corvina no fue agresiva hacia los consespecíficos, las observaciones del comportamiento general y en los videos no identificaron comportamientos agresivos como perseguir o morder y no hubo diferencias en la condición de las aletas entre los peces en los dos sistemas de alimentación. Las aletas pectorales, dorsales y de la cola mostraron un daño ligero en las aletas que era normal para la condición de retención. No hubo diferencia en el sensor superior e inferior en los tanques con diferentes sistemas de alimentación. Se observó que todos los peces permanecen bajos en el tanque durante el día y se elevan para llenar todo el tanque durante la noche. La única diferencia observada en el comportamiento entre los sistemas de alimentación fue en la velocidad de natación. Los peces en el sistema de alimentación de demanda automática tenían una velocidad de natación más baja que los peces en el sistema de alimentación programado. Esto parecía estar relacionado con la alimentación y la disponibilidad de alimento. Los peces en el sistema de alimentación de demanda automática tenían disponibilidad de alimento en todo momento y no aumentaban la velocidad de natación en respuesta al hambre y / o la entrega de alimento. Sin embargo, los peces en el sistema de alimentación programada tenían velocidades de natación más altas en respuesta al hambre y al suministro periódico de alimento. Esto también se destacó, ya que los peces en el sistema de alimentación programada tuvieron una velocidad de natación cambiante en respuesta al hambre y la entrega de alimentos durante el día. La velocidad de natación de los peces en el sistema de alimentación programada fue mayor en la mañana (10:30) inmediatamente después de la alimentación.

En general, el sistema de alimentación no afectó el comportamiento de la corvina. Corvina no fue agresiva hacia los consespecíficos, las observaciones del comportamiento general y en los videos no identificaron comportamientos agresivos como perseguir o morder y no hubo diferencias en la condición de las aletas entre los peces en los dos sistemas de alimentación. Las aletas pectorales, dorsales y de la cola mostraron un daño ligero en las aletas que era normal para la condición de retención. No hubo diferencia en el sensor superior e inferior en los tanques con diferentes sistemas de alimentación. Se observó que todos los peces permanecen bajos en el tanque durante el día y se elevan para llenar todo el tanque durante la noche. La única diferencia observada en el comportamiento entre los sistemas de alimentación fue en la velocidad de natación. Los peces en el sistema de alimentación de demanda automática tenían una velocidad de natación más baja que los peces en el sistema de alimentación programado. Esto parecía estar relacionado con la alimentación y la disponibilidad de alimento. Los peces en el sistema de alimentación de demanda automática tenían disponibilidad de alimento en todo momento y no aumentaban la velocidad de natación en respuesta al hambre y / o la entrega de alimento. Sin embargo, los peces en el sistema de alimentación programada tenían velocidades de natación más altas en respuesta al hambre y al suministro periódico de alimento. Esto también se destacó, ya que los peces en el sistema de alimentación programada tuvieron una velocidad de natación cambiante en respuesta al hambre y la entrega de alimentos durante el día. La velocidad de natación de los peces en el sistema de alimentación programada fue mayor en la mañana (10:30) inmediatamente después de la alimentación (09: 00-10: 00) y disminuyó al nivel más bajo a las 18:30 inmediatamente después de la alimentación por la tarde (17: 00-18: 00) que completó la ración del día para cumplir con el requisito de alimentación diaria de los peces.



5. Salud de los Peces

Granulomatosis sistémica. (Liderado por HCMR, Pantelis Katharios)

La granulomatosis sistémica (SG) es una condición patológica que afecta a la mayoría de las poblaciones cultivadas de corvina. La SG se caracteriza por múltiples granulomas en todos los tejidos blandos, que progresivamente se calcifican y son necróticos (Ghittino et al., 2004; P Katharios et al., 2011). La SG no está asociada con altas mortalidades; sin embargo, puede llevar a un menor crecimiento y rendimiento fisiológico durante el crecimiento y, además, afecta el producto final, lo que lo hace inaceptable para el consumidor. La etiología de la enfermedad es desconocida; sin embargo, se han planteado dos hipótesis. La primera es que es causada por patógenos bacterianos muy probablemente *Nocardia* spp. (Elkesh et al., 2013) y el segundo es que puede ser un trastorno metabólico (Ghittino et al., 2004; P Katharios et al., 2011) similar a los granulomas sistémicos observados en otras especies de peces cultivados.

Externamente, los peces muy afectados pueden ser demacrados, con erosión de las aletas, exoftalmia y en varios casos ceguera unilateral. Los granulomas visibles de varios tamaños generalmente se encuentran dispersos en los órganos internos. Hígado, riñón y bazo son los órganos más afectados por SG. En peces muy afectados con muchos granulomas visibles, gran parte del hígado y el riñón pueden ser necróticos y calcificados, mientras que el corazón puede estar completamente cubierto por nódulos de color blanco a crema (Fig. 54, 55). A nivel estereoscópico, las preparaciones de calabaza fresca de los tejidos afectados revelan la presencia de granulomas encapsulados por varias capas de tejido fibroso con una apariencia de "cebolla" (Fig. 56). Esta apariencia característica de "cebolla" también fue evidente en las fotos de microscopía electrónica de barrido (Fig. 57).



Figura 1. A,B. Lesiones externas en el ojo y la cola de corvina relacionados con SG. C,D. Calcificación distrófica del hígado y del riñón.



Figura 55. A. Granulomas múltiples en los tejidos blandos de la corvina. B. Corazón de corvina totalmente cubierto por granulomas.

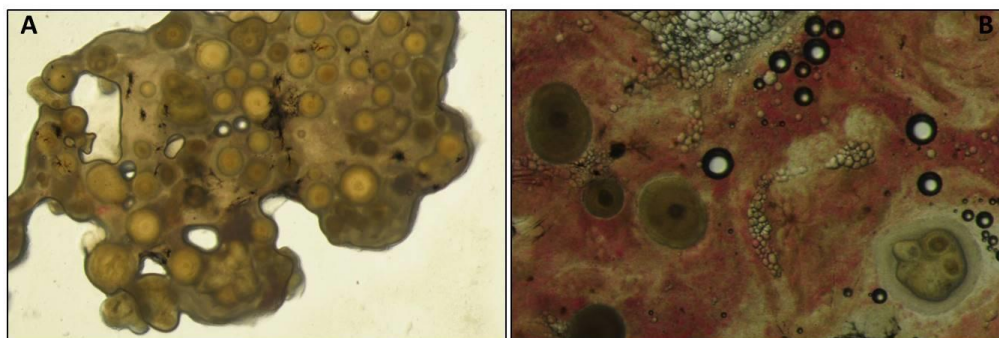


Figura 56. Preparación fresca de aplastamiento de hígado (A) y riñón (B) con granulomas (A: estereoscopio x1, B: estereoscopio x2.5).

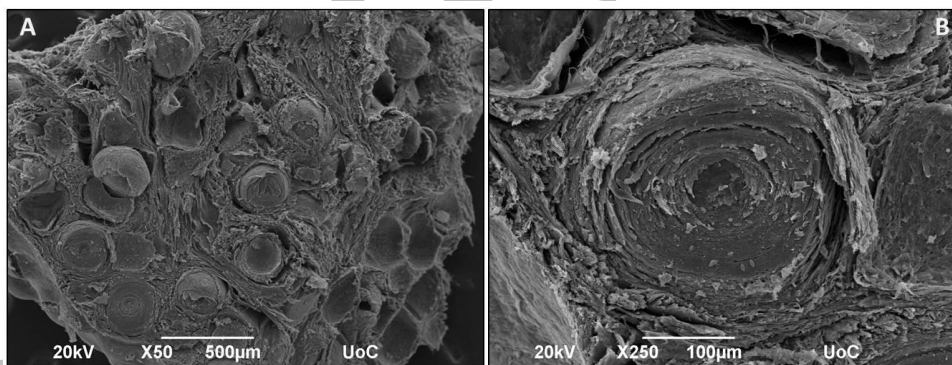


Figura 57. A. Microfotografía SEM del corazón cubierta por granulomas. B. Microfotografía SEM de un granuloma de corazón con apariencia de "cebolla".

Histológicamente, la morfología de los granulomas consiste en un área amorfa necrótica central rodeada por una capa multilamelar de células epiteloides y tejido fibroso. Se pueden identificar varias etapas de la formación de granuloma con las células epiteloides características en los tejidos examinados que van desde granulomas inmaduros, granulomas maduros de múltiples capas hasta nódulos grandes, posiblemente como resultado de la fusión de varios granulomas adyacentes que tenían grandes áreas de necrosis central con calcificación distrófica (Fig. 58, 59).

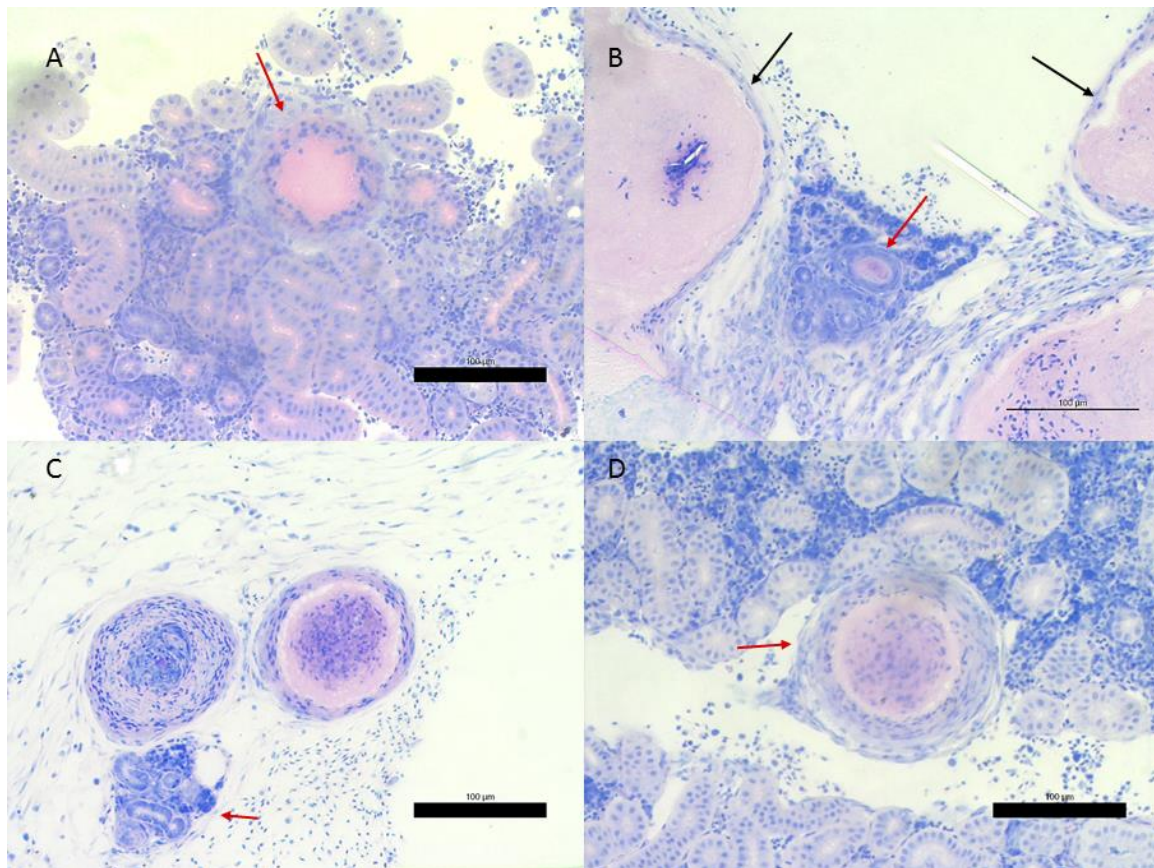


Figura 58. A. Granuloma inmaduro en el riñón de corvina. Hay un área amorfa, acelular, que está rodeada por células inflamatorias. B. Un granuloma inmaduro en el riñón (flecha roja) en un área pequeña de un riñón con apariencia normal. En este pez en particular hubo una necrosis caseosa extensa en este órgano, una pequeña parte de la cual está indicada con flechas negras. C. Dos granulomas adyacentes seccionados a diferentes niveles en una pequeña parte del tejido renal (flecha roja). D. Aspecto típico de un granuloma “joven” en el riñón.



Figura 59. Calcificación distrófica en el riñón de la corvina.

En algunos casos, principalmente en hígados, las etapas iniciales de los granulomas se localizan en las vesículas sanguíneas que se asemejan a una vasculitis (Fig. 60). En estos casos, también hay una participación de las células de Rodlet. Las células de Rodlet están presentes en grandes cantidades en



todos los tejidos. Las varillas se alinean como las células epiteliales en las membranas peritoneales, pero también se encuentran en los hígados, el páncreas y el intestino. (Fig. 61). Las características distintivas de estas células en forma de pera son la colección de rodlets (estructuras cristalinas lineales) dentro de su citoplasma y la membrana gruesa circundante.

En condiciones específicas, las células rodlet expulsan sus rodlets en el entorno extracelular. La composición de los rodlets no se conoce, sin embargo, se ha demostrado que contienen el péptido antimicrobiano piscidina. Por lo tanto, su naturaleza secretora podría estar conectada al mecanismo de defensa de la corvina contra la infección. Sin embargo, esto no puede ser totalmente soportado ya que no hay datos sobre la presencia de estas células en especímenes normales o salvajes.

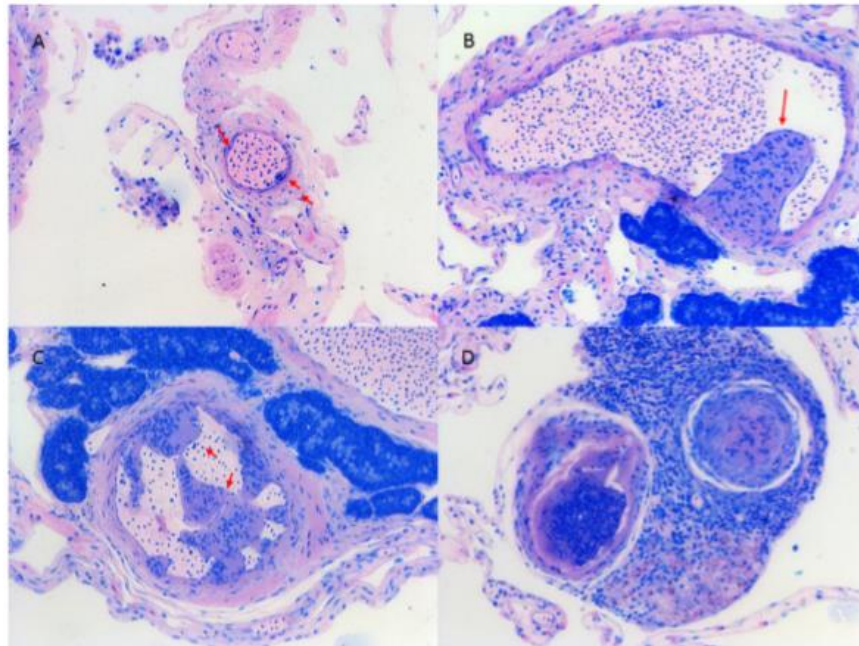


Figura 60. La implicación de los vasos sanguíneos es evidente en la manifestación de la enfermedad. Se muestran varias secciones de vasos sanguíneos de las membranas peritoneales y el hígado de los peces afectados. Existen crecimientos específicos compuestos de células inflamatorias en el endotelio de los vasos, que se indican con flechas rojas. En etapas más avanzadas (C, D), estos crecimientos parecen bloquear la luz del vaso.

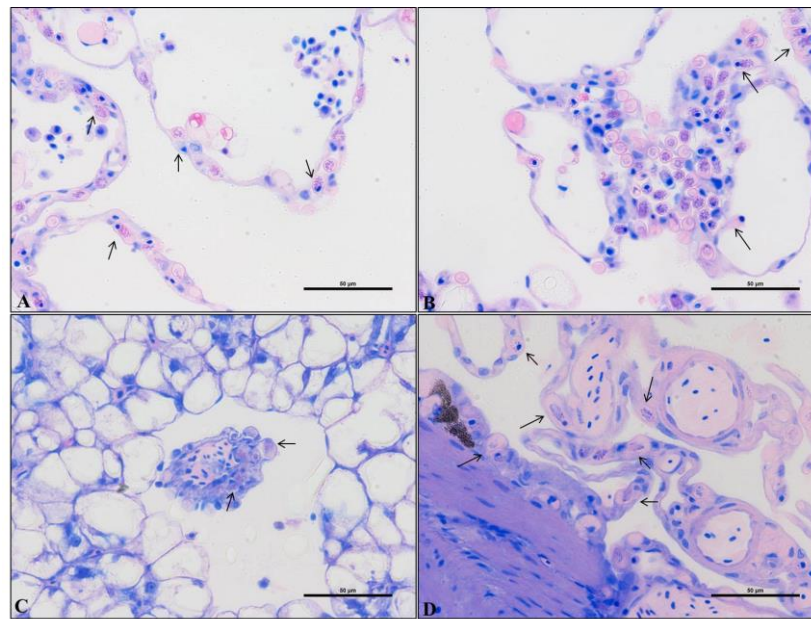


Figura 61. Células de Rodlet (flechas negras) alineadas en las membranas peritoneales (A, B) y las paredes de los vasos sanguíneos circundantes (C, D).

Dado que la hipótesis del agente infeccioso también se investigó en el proyecto, se examinó una gran cantidad de peces para el aislamiento y la caracterización de *Nocardia* spp. que ha sido propuesto como el factor etiológico de la SG. Para demostrar la presencia de agentes infecciosos, hemos aplicado tinciones especiales en muchas muestras de corvina diferentes con granulomas. Los resultados de estas tinciones específicas (Ziel-Neelsen, FiteFaraco y Gram Stain) fueron negativos. Tras un extenso muestreo, solo hemos identificado un caso de nocardiosis en corvina, originados en el mismo lugar geográfico donde se informó por primera vez. El análisis histológico de los peces positivos a *Nocardia* reveló la presencia de bacterias filamentosas, con cuentas y ramificadas, morfología consistente con la descripción de *Nocardia* spp. en corvina (Elkesh et al., 2013). La tinción de Ziehl-Neelsen fue débilmente positiva en las colonias ubicadas en las lesiones de la piel. Las colonias bacterianas no fueron demarcadas por una formación granulomatosa (Fig. 62 A, B, C). Los granulomas típicos también estaban presentes en todos los tejidos examinados. En estos granulomas, no se pudieron ver bacterias (Fig. 62D).

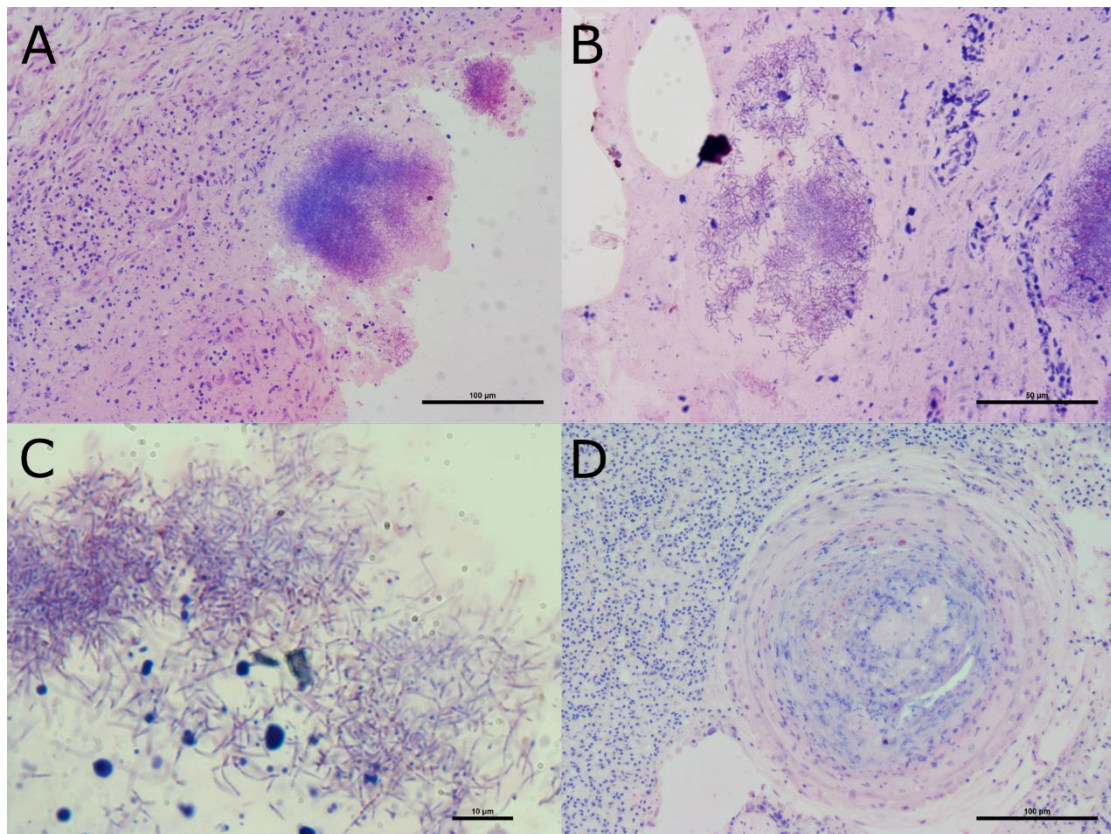


Figura 62. A, B. Corte histológico de una lesión dérmica de una corvina *Nocardia* positiva (azul de metileno / azul II / tinción de fucsina básica). Hay varias colonias bacterianas, que han provocado una respuesta moderada del huésped. C. Mayor aumento de las colonias bacterianas de lesiones dérmicas. Tenga en cuenta la morfología de ramificación filamentososa de las bacterias que son consistentes con las descripciones de *Nocardia* spp. En otras especies de peces. Ziehl Neelsen mancha. D. Un granuloma no bacteriano en el bazo con la morfología típica observada en SG (azul de metileno / azul II / tinción con fucsina básica).

Análisis bioquímico

Los análisis de enzimas hepáticas séricas como ALT, AST y ALP se han propuesto como los principales biomarcadores para las enfermedades hepáticas. En general, la elevación de las concentraciones de ALT y AST puede indicar enfermedades hepatocelulares, mientras que la elevación de ALP puede indicar enfermedades colestásicas del hígado. El análisis de estas enzimas séricas mostró que, independientemente de las dietas, la actividad de ALP, ALT y AST aumentó en peces con granulomas o calcificación de tejidos en comparación con peces sin (Fig. 63). Los aumentos en las actividades de AST y ALT indican lesiones de las células hepáticas causadas por diversos químicos o peroxidación lipídica, mientras que la actividad ALP plasmática elevada corresponde a una reacción inflamatoria de los conductos biliares. En tejidos dañados, las membranas celulares se vuelven más permeables, liberando algunas enzimas a la sangre y modificando así los valores plasmáticos normales. En los peces, la ALP y AST plasmáticos elevados se han asociado con trastornos hepáticos o óseos, por lo que esos resultados pueden asociarse con la SG, pero es necesario realizar más investigaciones.

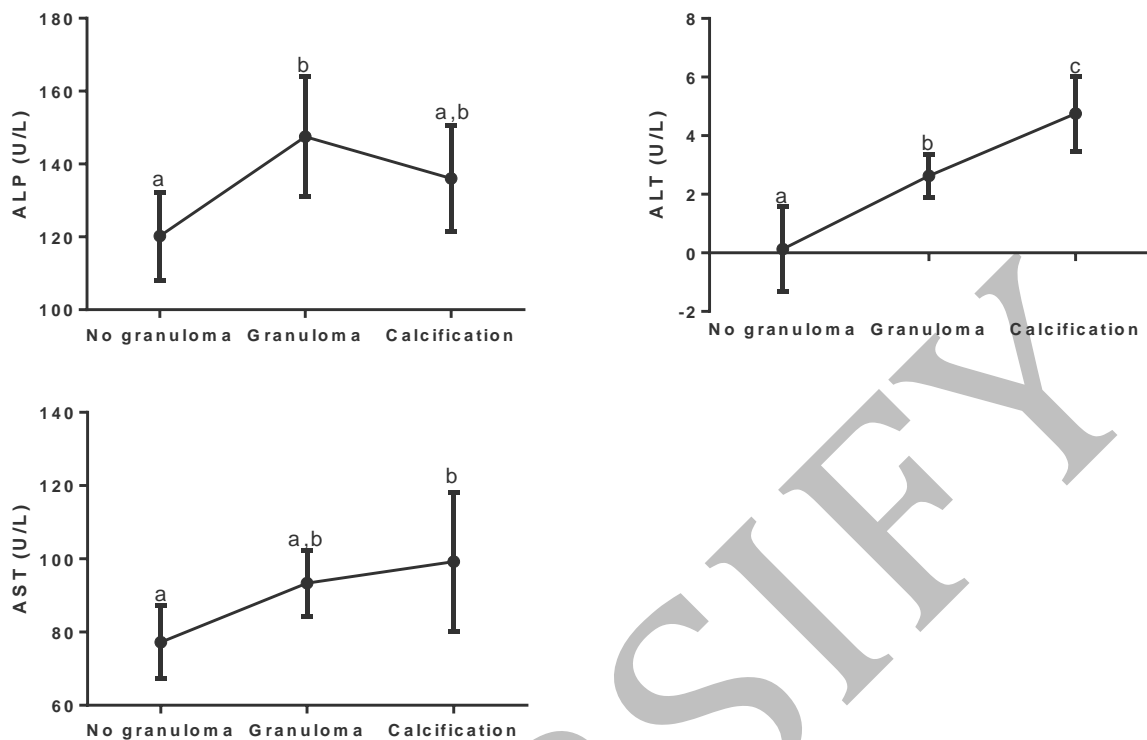


Figura 63. Concentraciones medias (\pm SD) de ALP, ALT y AST en corvina sin granulomas, granulomas y calcificación de un solo tejido al final del experimento de Vitamina D3 (Tarea 24.1). Letras diferentes (a, b) muestran diferencias estadísticamente significativas entre las tres condiciones ($p < 0,005$).

Se realizaron varios ensayos nutricionales en el proyecto DIVERSIFY para investigar la hipótesis del trastorno metabólico.

La hipótesis del trastorno metabólico (Ghittino et al., 2004; P Katharios et al., 2011) se ha planteado debido a los granulomas sistémicos similares observados en otras especies de peces cultivados, como la dorada (*Sparus aurata*), la trucha arcoiris (*Salmo gairdneri*) y el rodaballo (*Scophthalmus maximus*). En todos los casos, el desarrollo de la enfermedad se ha asociado con un desequilibrio nutricional en minerales y vitaminas o una insuficiencia debido al uso de fuentes de proteínas vegetales o alimentos formulados almacenados a largo plazo o pescado congelado.

Realizamos varios ensayos de alimentación para evaluar el efecto de los niveles de vitamina D y Ca / P en los alimentos (HCMR), el efecto de los ingredientes de las plantas en los alimentos (HCMR), así como el efecto de los niveles de minerales y vitaminas (FCPCT)

Ensayo 1. El efecto de las inclusiones de vitamina D3 en las dietas en el desarrollo de SG en corvina (HCMR)

Para el ensayo de vitamina D3, se prepararon cuatro dietas experimentales con niveles crecientes de vitamina D3 en HCMR (Atenas, Grecia). Se utilizaron juveniles de Corvina de 4 g de peso promedio ($n = 600$) para el ensayo de alimentación. Se utilizaron tres réplicas para cada dieta. La prueba de alimentación duró 93 días. Al final de la prueba de alimentación, se tomaron muestras para la evaluación de granuloma e histología, estimación de biomarcadores específicos (enzimas CYP27, CYP24) y actividad de enzimas antioxidantes y análisis de plasma.



Para evaluar el estado de los peces con respecto a la presencia de granulomas, se desarrolló un método semicuantitativo basado en la evaluación gradual de la gravedad de las lesiones en los órganos internos de los individuos examinados. Cada pez fue diseccionado y los órganos internos fueron examinados macroscópicamente. Las preparaciones de calabaza fresca de corazón, hígado, intestino, bazo, vejiga natatoria, peritoneo y riñón se evaluaron bajo un estereoscopio. Para el estado general de cada individuo, se calculó la suma de las puntuaciones de los distintos tejidos. La escala de evaluación utilizada fue de acuerdo con el siguiente sistema de puntuación que se muestra en la Tabla 26.

Tabla 26. Escala de evaluación utilizada para la evaluación de granulomas.

Score 0	No granulomas
Score 1	Granulomas visible only with microscopy
Score 2	Granulomas visible macroscopically
Score 5	Tissue calcification

Resultado principal: la suplementación con vitamina D3 no tiene ningún efecto en el desarrollo de la SG.

Ensayo 2. El efecto de la relación Ca: P en la dieta sobre el desarrollo de SG (HCMR)

Para este ensayo, se formularon nueve dietas experimentales con diferentes niveles de Ca y P en el Centro de Investigación de Acuicultura SKRETTING (SARC), Noruega. La dieta basal se formuló para contener aproximadamente un 53% de proteína cruda y un 15% de lípido crudo. P se suplementó por separado a la dieta basal de la mezcla para obtener varias concentraciones de P, mientras que la cantidad de Ca que se suplementó en la dieta basal se calculó que era igual o doble a la cantidad de juveniles de P. Corvina de 1 g de peso promedio (se utilizaron n = 1350 para el ensayo de alimentación. Se asignaron tres réplicas a cada dieta. El ensayo de alimentación duró 4 meses. Al final del ensayo de alimentación se tomaron muestras para la evaluación e histología del granuloma, la composición corporal y mineral, la estimación de biomarcadores (enzimas CYP27, CYP24) y análisis de plasma. La granulomatosis se evaluó mediante el sistema de puntuación de escala ordinal semicuantitativa descrito en la Tabla 1.

Resultado principal: el alto contenido de P en las dietas (15 g kg⁻¹) mejoró la gravedad de la granulomatosis.

Prueba 3. El efecto de las dietas altas en proteínas vegetales en el desarrollo de SG (HCMR)

El propósito de este tercer ensayo fue examinar si el reemplazo de FM por fuentes de PP afecta el desarrollo de SG. Además, debido a los resultados obtenidos en el ensayo anterior, también investigamos si la suplementación con P en las dietas de PP tiene algún efecto sobre la SG. Se formularon cuatro dietas experimentales en el Centro de Investigación de Acuicultura SKRETTING (SARC) con 60% (FM) y 14% de harina de pescado (PP) y niveles crecientes de P en las dietas con 14% de harina de pescado (PP + medio P, PP + alto P). Se utilizaron juveniles de Corvina de 2 g de peso promedio (n = 600) para el ensayo de alimentación. La prueba de alimentación duró 3 meses (agosto-noviembre 2016). Al final de la prueba de alimentación, se tomaron muestras para la evaluación de granuloma, histología y análisis de plasma. La granulomatosis se evaluó utilizando el sistema de puntuación de escala ordinal semicuantitativa descrito en la Tabla 1.

Resultado principal: Se encontró que las proteínas vegetales en las dietas de corvina afectaban negativamente a la SG, mientras que la suplementación con P en las dietas PP no afectó la condición general, pero tuvo un efecto positivo en el hígado de los peces.

Prueba 4. El efecto combinado de las vitaminas E, C y carotenoides en el desarrollo de SG (FCPCT)



Se prepararon seis dietas experimentales agregando diferentes niveles de vitamina E, C y astaxantina. Se obtuvieron juveniles de Corvina de 79 g de peso promedio ($n = 900$) mediante desove inducido por reproductores en las instalaciones de ECOAQUA (FCPCT, Universidad de Las Palmas de Gran Canaria, Taliarte, Islas Canarias, España). La prueba de alimentación duró 135 días. Se tomaron muestras para la evaluación macroscópica de granulomas, histología, análisis bioquímico y expresión génica de glutatión peroxidasa (GPX), superóxido dismutasa (SOD) y catalasa (CAT). La gravedad de la granulomatosis se calificó en cada órgano utilizando un método cuantitativo que se desarrolló de acuerdo con los siguientes criterios que se muestran en la Tabla 27. La puntuación fue dependiente del órgano, porque la cantidad de granulomas en cada órgano fue variable.

Tabla 27. Puntaje de severidad de granulomas en hígado, riñón y corazón.

Score	Liver	Kidney	Heart
0	No granulomas	No granulomas	No granulomas
1	$1 \leq 10$ granulomas	$1 \leq 3$ granulomas	$1 \leq 1$ granulomas
2	$10 \leq 30$ granulomas	$3 \leq 6$ granulomas	$2 \leq 2$ granulomas
3	> 30 granulomas	> 6 granulomas	> 3 granulomas

Resultado principal: La combinación de un alto contenido dietético de los antioxidantes vitamina E y C aumentó la incidencia y el número de peces con menor gravedad de SG.

Prueba 5. El efecto de Se, Mn y Se en el desarrollo de SG. (FCPCT)

Se prepararon cinco piensos isolipídicos e isoproteicos de pescado y a base de aceite de pescado agregando diferentes niveles de vitamina C, Mn, Zn y Se. Se obtuvieron juveniles de Corvina de 15 g de peso promedio ($n = 2100$) mediante desove inducido por los reproductores en las instalaciones de ECOAQUA (FCPCT, Universidad de Las Palmas de Gran Canaria, Taliarte, Islas Canarias, España). La prueba de alimentación duró 90 días. Se tomaron muestras para la evaluación macroscópica de granulomas, histología, análisis bioquímico y expresión génica de glutatión peroxidasa (GPX), superóxido dismutasa (SOD) y catalasa (CAT). La gravedad de la granulomatosis se calificó en cada órgano mediante un método cuantitativo que se desarrolló de acuerdo con los siguientes criterios que se muestran en la Tabla 2.

Resultado principal: la adición de minerales diana no mejoró la incidencia o gravedad del granuloma, pero los niveles recomendados de minerales son: $40 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ de Mn, $200 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ de Zn y $1,5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ de Se

Conclusiones generales y recomendaciones para SG en corvina.

- La nocardiosis está presente en Grecia, muy probablemente en una región geográfica limitada; sin embargo, no es la causa de SG.
- La suplementación con vitamina D3 no afectó el desarrollo de la SG,
- El alto contenido de P en la dieta parece mejorar la condición
- El reemplazo de proteínas vegetales afecta negativamente la progresión de la SG.
- El alto contenido dietético de los antioxidantes vitamina E y C aumentó la incidencia y el número de peces con menor severidad de SG
- La adición de Se, Mn y Se no mejoró la incidencia o gravedad del granuloma.



En conjunto, la mejora de la SG por el cambio en la dieta con la ausencia de patógenos en la población afectada por la SG creemos que la hipótesis metabólica es más probable. La aparición de un solo caso de nocardiosis con diferentes características refuerza esta hipótesis.

Sin embargo, aún se desconoce la etiología y se deben probar otros factores metabólicos nutricionales.

Teniendo en cuenta todos los resultados anteriores, nuestras recomendaciones para la prevención de SG en corvina son:

- Una dieta combinada con alto porcentaje de harina de pescado (60%) y alto contenido dietético de P (15g/kg-1) y antioxidantes vitaminas E y C.
- Dado que no hay datos disponibles sobre la reversibilidad de la SG, recomendamos comenzar a alimentar con esta dieta cuando el peso del pescado sea de aproximadamente 2 g.

Dermatopatía ulcerativa crónica (CUD) en la corvina

(Liderado por HCMR, Pantelis Katharios)

La línea lateral es un sistema mecanosensorial que se encuentra en todos los peces y en las larvas de anfibios acuáticos, que se utiliza para la detección de movimientos de agua y / o fluctuaciones de presión (Bleckmann y Zelick, 2009; Webb y Shirey, 2003). Los receptores de la línea lateral que detectan el flujo de agua se llaman neuromastos y se distribuyen en la cabeza, el tronco y la cola de los peces. Los neuromas pueden ser superficiales en la piel o encerrados en los canales llenos de líquido de la línea lateral que se abren al ambiente a través de una serie de poros (Bleckmann y Zelick, 2009; Webb, 1989). En la Fig. 64 se presenta un aspecto esquemático del sistema de la línea lateral, los canales y los neuromastos. Se ha demostrado que los canales de la línea lateral se desarrollan a través de un proceso de remodelación ósea con la implicación de ambos osteoblastos para la aposición ósea y osteoclastos para la reabsorción ósea (Wada et al., 2014).

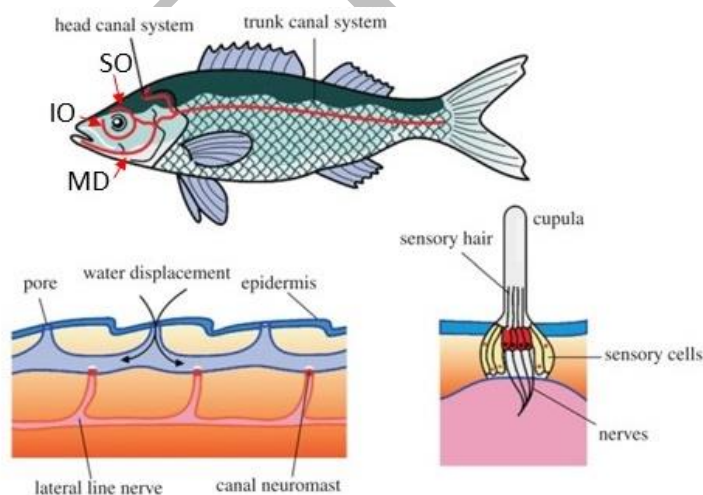


Figura 64. Sistema de línea lateral en peces. Estructura del canal de la línea lateral y de un neuromast. SO: canal supraorbital, IO: canal infraorbital, MD; Canal mandibular (de Dagamseh et al., 2013 con modificaciones).

La dermatopatía ulcerativa crónica (CUD, por sus siglas en inglés) es una afección recientemente descrita que afecta los canales de la línea lateral de muchos peces cultivados, tanto de agua dulce como marina. Se ha descrito en el bacalao de Murray de peces de agua dulce de Australia, *Maccullochella peellii peellii* en sitios abastecidos por agua subterránea (Baily et al., 2005; Schultz et al., 2011, 2008). La enfermedad produce una erosión focal, ulceración y pérdida de epidermis alrededor de los canales de la línea lateral de la cabeza y el tronco, y una erosión de la aleta. Se ha asociado con la reducción de las tasas de crecimiento, el aumento de la mortalidad y la reducción significativa de la comercialización



debido a la desfiguración grave de los peces afectados (Baily et al., 2005; Schultz et al., 2008). La misma condición también se informó para el pez dorado *Carassius auratus* después de la exposición a aguas subterráneas de agua dulce (Baily et al., 2005). Con respecto a las especies marinas, se informó que la CUD afectaba a la dorada del mar, *Diplodus puntazzo*, después del cultivo en aguas subterráneas salinas (Katharios et al., 2011). Para la dorada brisa, los autores sugirieron que hay una indicación de actividad enzimática osteoclástica en el pez afectado. Las enzimas implicadas en la remodelación ósea de los canales de la línea lateral son la fosfatasa ácida (TRAP) de resistencia a la tartrato y la catepsina K para la resorción ósea, y la vATPasa para la aposición ósea. Tanto para el bacalao Murray como para la dorada parda, los autores informaron que las lesiones se resuelven si los peces se transfieren a agua dulce natural y agua de mar, respectivamente, y no pudieron asociar la enfermedad con ningún agente infeccioso. La conclusión final de ambos estudios fue que el desarrollo de la enfermedad se correlaciona con el uso de fuentes de agua subterránea. Sin embargo, la etiología aún se desconoce, ya que no pudieron establecer el componente exacto del agua que resulta del desarrollo de la enfermedad (Baily et al., 2005; Katharios et al., 2011; Schultz et al., 2011, 2008). Una condición similar bajo el término "despigmentación de la línea lateral" ha sido reportada en el bagre de canal. En este caso, los autores concluyeron que el agente causal del desarrollo de la enfermedad fue la exposición de los peces al estrés nutricional crónico a los 12 meses de ayuno (Corrales et al., 2009).

La corvina es una de las especies de peces sensibles de CUD. La enfermedad afecta al 100% de la población y provoca ulceración de la piel que recubre los canales de la línea lateral, sin embargo, no se asocia con mortalidades (Rigos y Katharios, 2010). El objetivo de este estudio fue describir la enfermedad en corvina usando histología y SEM e investigar la actividad de los osteoclastos usando marcadores moleculares. A través de este estudio, el objetivo final fue investigar la etiología de la enfermedad y sugerir medidas preventivas.

Se realizaron dos pruebas de cría paralelas de corvina en pozo y agua de mar natural para estudiar el desarrollo de la CUD. Los huevos producidos en las instalaciones de HCMR, Creta, Grecia, se utilizaron para la prueba de crianza, que se realizó en tanques duplicados de 40 m³. El ensayo de crianza duró de 1 a 56 días después de la eclosión (dph). Todos los días, se realizaron mediciones de pH, CO₂, O₂ y T en las dos fuentes de agua.

Al final de la prueba de crianza, todos los peces criados en el agua de pozo tenían lesiones visibles asociadas con CUD en comparación con los peces criados en agua de mar natural (Fig. 65).



Figura 65. Corvina criada en agua de mar natural (izquierda) y agua de pozo (derecha). Todos los peces criados en agua de pozo tenían lesiones visibles en la cabeza asociadas con CUD.

La longitud y el peso promedio de los peces de las diferentes fuentes de agua al final del ensayo de crianza (56 dph) se presentan en la Fig. 66. El rendimiento del crecimiento de los peces no se vio afectado por la fuente de agua diferente ($p > 0.05$)

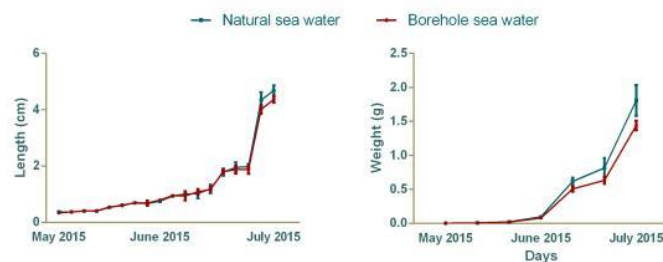


Figura 66. Longitud y peso promedio de corvina criada en pozo y agua de mar natural. Los valores son media \pm SD.

La transferencia de agua de pozo a agua de mar natural de la corvina afectada por CUD llevó a una recuperación casi completa de las lesiones en 5 meses (Fig. 67).

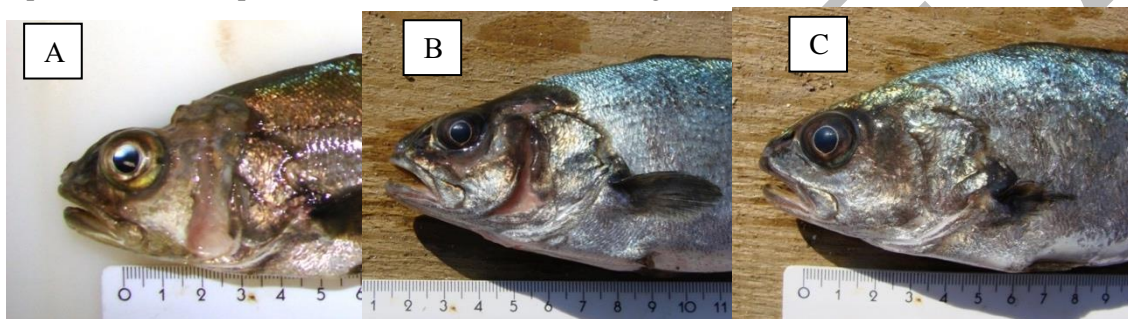


Figura 67. A. Corvina de nueve meses criada únicamente en agua de mar de pozo. B. Corvina de nueve meses transferida a agua de mar natural durante 5 meses, con resolución parcial de las lesiones. C. Corvina de nueve meses transferida a agua de mar natural durante 5 meses, con resolución completa de las lesiones.

Los resultados de los estudios en DIVERSIFY indicaron que la CUD en corvina se induce mediante el uso de agua de pozo, que está de acuerdo con las conclusiones de Baily et al. (2005) y Schultz et al. (2008) para el bacalao Murray y de Katharios et al. (2011) para la dorada brisa. Además, otra similitud con el bacalao de Murray y la dorada parrillera es que las lesiones se resuelven si los peces se transfieren al agua de mar natural. Los resultados de la histología y la SEM confirmaron que las lesiones estaban limitadas a la línea lateral del órgano en la cabeza.

Desde el análisis fisicoquímico de las dos fuentes de agua, cabe destacar que el pH fue más bajo y el CO₂ más alto en el agua de pozo en comparación con el agua de mar natural. Katharios et al. (2011) plantearon la hipótesis de que el agua de pozo que es rica en CO₂, como lo indica también el pH más bajo en comparación con el pH del agua de mar natural, aumenta la actividad enzimática de los osteoclastos. El CO₂ activa los osteoclastos, que están muy cerca del medio ambiente, como los osteoclastos de los canales de la línea lateral. En este escenario, habría un desequilibrio inducido por el medio ambiente entre los osteoclastos (células que reabsorben los huesos) y los osteoblastos (células que depositan los huesos) que causaría las lesiones observadas en los peces, ubicadas exclusivamente en los canales de la línea lateral. Sobre la base de estos resultados, realizamos un segundo ensayo de cría para investigar si el CO₂ en el agua de pozo es el agente etiológico que causa el desarrollo de lesiones CUD. En este ensayo, utilizamos 2 tanques de cría paralelos suministrados con agua de mar natural. En uno de estos tanques ajustamos el pH a 7.4 infundiendo CO₂. Cultivamos corvina desde huevos hasta 60 dph. La falta de lesiones en la cabeza y el tronco de los peces luego de un examen visual en este estudio, sugiere que ni el pH ni el CO₂ son los factores que afectan el desarrollo de las lesiones de CUD.



Eisler y Gardner (1973) encontraron que el cobre solo o en combinación con zinc o cadmio daña el epitelio de los canales en la cabeza de mummichog (*Fundulus heteroclitus*). Las instalaciones y las fuentes de agua que utilizamos para este ensayo fueron las mismas que Katharios et al. (2011) utilizado para el estudio de la CUD en la dorada brusca. Del análisis de metales pesados de muestras de agua, encontraron que el agua de pozo tenía mayores concentraciones de cobre, plomo, níquel y zinc que el agua de mar natural, sin embargo, estos niveles estaban dentro de los límites aceptables para la acuicultura marina y mucho más bajos que los límites tóxicos. Nuestros resultados del análisis de metales de la cabeza de corvina criada en las dos fuentes de agua diferentes mostraron que la concentración de cobre fue significativamente mayor en la cabeza de corvina criada en agua de pozo que en la cabeza de corvina criada en agua de mar natural. Sin embargo, las concentraciones de todos los metales fueron comparables a los datos publicados de otras especies de peces cultivados y silvestres donde las lesiones están ausentes (Alasalvar et al., 2002; Kalantzi et al., 2016, 2013; Zotos y Vouzanidou, 2012). Sin embargo, no se puede descartar la toxicidad de los metales como factor causante del desarrollo de la CUD debido al menor pH del agua de pozo y el mayor tiempo de exposición de los peces.

Además, otra similitud interesante entre la corvina afectada por la CUD y el bacalao Murray afectado por la CUD es la presencia de las células enigmáticas de Rodlet. Schultz et al. (2014) encontraron un número significativamente mayor de células rodlet en las branquias, riñones e intestinos del bacalao Murray afectado por CUD y asumieron que era una respuesta a un tóxico en el agua subterránea. En esta tarea no examinamos los tejidos blandos de la corvina. Sin embargo, en los ensayos para investigar las causas de la granulomatosis sistémica, utilizamos corvina criada en agua de pozo con lesiones visibles asociadas a CUD. Como hemos descrito en los entregables 24.1, 24.2 y 24.5, las células de Rodlet en la corvina están presentes en grandes cantidades, alineadas como células epiteliales en las membranas peritoneales, hígado, páncreas, intestino y riñón. Tanto en la corvina como en el bacalao de Murray, no se identificaron patógenos en ningún tejido, por lo que la naturaleza secretora o las células de Rodlet podrían estar conectadas a los mecanismos de defensa de los peces contra un tóxico en el agua. Sin embargo, esta hipótesis no puede respaldarse por completo, ya que no existen datos sobre la presencia de estas células en condiciones normales (no afectadas por granulomatosis sistémica o CUD) o corvina silvestre.

Aunque la enfermedad está directamente relacionada con el uso de agua de pozo, el agente causal aún es desconocido para la corvina, así como para el bacalao Murray y la dorada brisa. Para todas las especies, las lesiones se resuelven cuando los peces se transfieren a agua dulce natural o agua de mar (Baily et al., 2005; Katharios et al., 2011). Además para el bacalao de Murray, Schultz et al. (2011) encontraron que la retención de agua subterránea en un estanque de tierra con vegetación o en un tanque que contiene biopelículas que crecen en un macrófito artificial durante 72 h impide el desarrollo de la CUD. Por lo tanto, se recomienda evitar el agua de mar de pozo para la crianza de corvina si se dispone de fuentes naturales de agua de mar y prestar especial atención a la fuente de agua utilizada. Alternativamente, el tiempo de residencia de la corvina en el agua del pozo debe reducirse al mínimo necesario, y el pescado debe trasladarse al agua natural del mar (por ejemplo, en jaulas marinas) tan pronto como sea posible una vez que se complete la fase de vivero, para permitir la regeneración del tejido. Proceso para completar antes de comercializar el pescado.

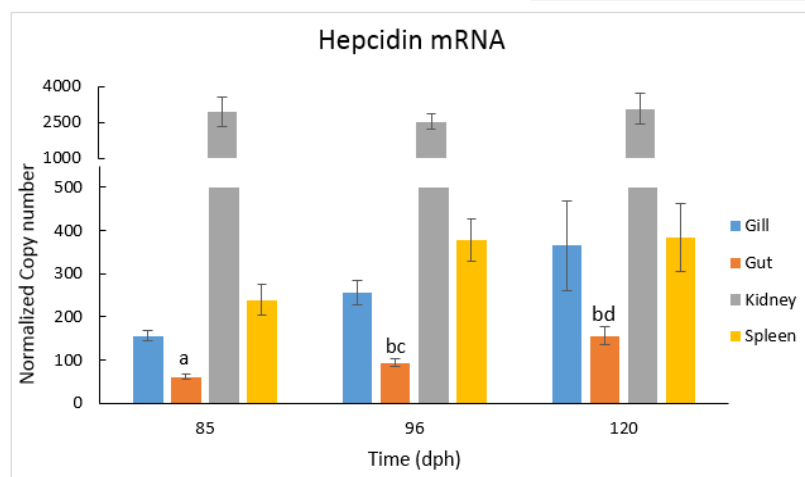
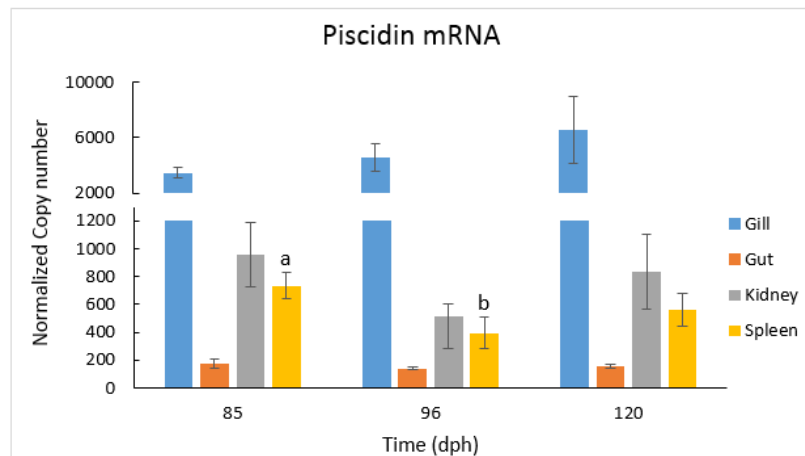
Temas de salud de los peces y tratamientos antiparasitarios.

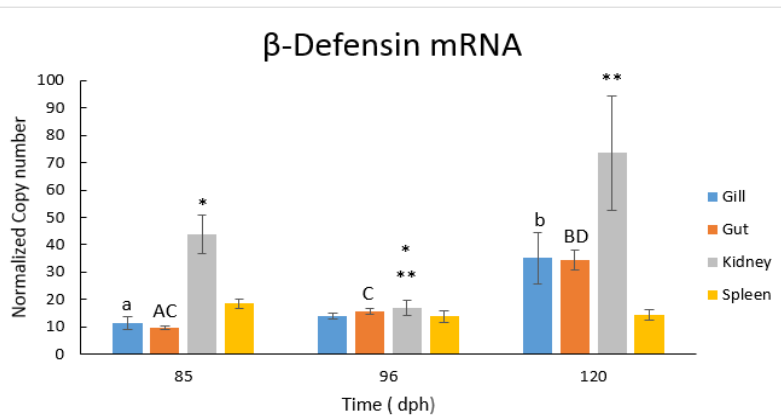
(Liderado por IRTA, Andre Karl and Ana Roque)

En todos los sectores de la acuicultura, la salud de los animales es un factor limitante para el desarrollo económico sostenible. Para obtener alguna ventaja en este tema en beneficio de la industria, el proyecto ha emprendido estudios de varios problemas conocidos relacionados con la salud, como se vio anteriormente en las secciones sobre granulomatosis sistémica y dermatitis ulcerativa crónica. Los estudios del sistema inmunitario de corvina han identificado varios genes invocados durante una respuesta inmunitaria. Entre otros genes examinados están los efectores de respuesta innata



(complemento C3, metalotioneína, lisozima, proteína MX, ciclooxygenasa 2), péptidos antimicrobianos (hepcidina, piscidina, defensina) (Campoverde et al. 2017), algunas citoquinas (interleucinas e interferones) e inmunoglobulinas (inmunoglobulina M e inmunoglobulina T). La ontogenia de expresión se examinó con el propósito de comprender la tasa de maduración del sistema inmunitario y obtener una mejor comprensión del momento en que el sistema inmunitario es completamente funcional. El desarrollo futuro de la vacuna dependerá de la capacidad de la memoria inmunológica específica, y esto depende del funcionamiento completo de todos estos genes y sus productos proteínicos. Gran parte de esta respuesta inmune se lleva a cabo dentro de los tejidos linfoides y células específicas de la sangre periférica. En este trabajo nos centramos en cuatro tejidos: tejidos inmunes de la mucosa del intestino y branquias y tejidos linfoides del riñón y el bazo. Dos puntos importantes que se notaron fueron los cambios significativos en la expresión que se producen en el momento del destete, y la expresión de la serie completa de genes examinados no se realizó hasta 86 días después de la eclosión. Por lo tanto, 86 días después de la eclosión sería la fecha más temprana en la que el sistema inmunitario respondería a la vacunación. El destete es una época de estrés fisiológico para las larvas de peces. El cambio de alimentación significa que el sistema inmune inmaduro está siendo expuesto a nuevas fuentes de antígeno por primera vez. Esto se ve claramente con la expresión de péptidos antimicrobianos cuya expresión se desencadena por la exposición a proteínas bacterianas y sus péptidos antigénicos componentes. Cada uno de estos efectores antimicrobianos se expresa diferencialmente en tejidos particulares. La piscidina se expresa preferentemente en las branquias, un sitio primario de exposición a antígenos del ambiente, mientras que la hepcidina se expresa más altamente en el riñón donde se filtra la sangre y muchas partículas extrañas son fagocitadas por los glóbulos blancos producidos en el riñón pronephron. (Fig. 68).





C)

Figura 68. A). Expresión de piscidina en tres puntos de tiempo diferentes en cuatro tejidos distintos. B. Expresión de hepcidina en tres puntos de tiempo diferentes en cuatro tejidos distintos. C. Expresión de la defensina en tres puntos de tiempo diferentes en cuatro tejidos distintos. La expresión de cada uno de los péptidos antimicrobianos identificados es específica del tiempo y del tejido.

Las respuestas proinflamatorias están controladas por múltiples vías de señalización que utilizan citoquinas como mensajeros. Durante las investigaciones, se encontraron múltiples isoformas del factor de necrosis tumoral e interferón (Milne et al 2017; Milne et al. 2018). Las múltiples isoformas de interferón (IFNc, IFNd e IFNh) son interesantes porque sugieren una mejor respuesta antiviral del sistema inmunológico, ya que esta citoquina es una de las principales moléculas de señalización para provocar una respuesta inmunitaria antiviral. Como se ve en la Fig. 69, las diferentes isoformas se expresan de manera distinta en cada uno de los tejidos analizados (Milne et al. 2018).

IFN isoforms

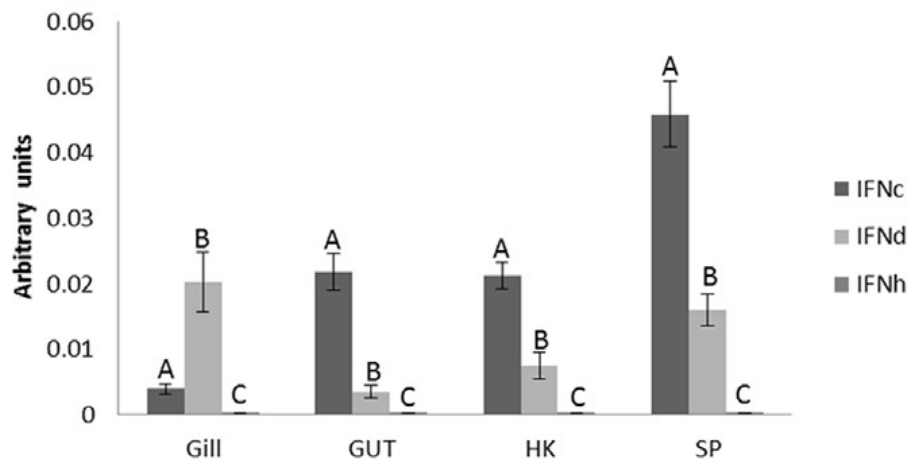


Figura 69. Expresión constitutiva de isoformas de IFN de corvina en cuatro tejidos inmunes. El ARN total se extrajo de los tejidos y los transcritos de IFN se detectaron mediante qPCR y se normalizaron a GAPDH. La gráfica muestra cómo cada subgrupo se expresa en relación con los demás dentro de un tejido. HK = cabeza del riñón, SP = bazo. Las barras son unidades arbitrarias medias \pm SEM, N = 10. Las letras denotan diferencias significativas ($P < 0.05$) entre subgrupos dentro de un tejido.

Como se muestra arriba, el repertorio innato antibacteriano y antiviral de las respuestas del sistema inmune de la corvina no es insignificante. La respuesta a los patógenos parasitarios que conducen a la patología está algo menos bien documentada. Una revisión de la patología que afecta a la corvina muestra que hay algunos informes de enfermedades bacterianas (vibriosis, nocardiosis), ciliados



(*Amiloodinium* sp.) Y varios trematodos (Merella et al., 2009; Terengo et al. 2010; Elkesh et al. . 2012; Soares et al. 2018). Se sabe que parásitos como *Sciaenacotyle panceri*, que se encuentra en las branquias de corvina (Merella et al. 2009), causan mortalidad en granjas en el Mediterráneo y requieren el desarrollo de tratamientos apropiados.

Con este objetivo, la investigación se centró en el uso de aceites esenciales (OE) con propiedades de vermífida que tenían el potencial de mezclarse en el alimento, por lo que podían administrarse por vía oral. Se realizó una prueba para evaluar la tolerancia de los peces a cada producto químico que se consideró un tratamiento potencial. Al final de cada prueba, los peces se sacrificaron humanamente y se tomaron muestras de las branquias y la sangre. Las branquias se fijaron y analizaron por histología para evaluar cualquier daño causado a nivel del tejido, ya sea por el tratamiento potencial o por el parásito en caso de que se encontraran en la población de prueba durante el curso de los ensayos de tratamiento. Se extrajo plasma de la sangre y se analizaron los niveles de cortisol, glucosa y lactato, que son indicadores generales de estrés. Se repitieron los tratamientos que demostraron una eficacia potencial. Se realizaron cuatro pruebas. El primero en elegir los aceites aceptados por el pescado, el segundo y el tercero evaluaron la toxicidad del aceite de canela y menta durante 6 semanas. Aunque el tracto digestivo no se alteró, los peces no se alimentaron bien y crecieron menos. Sin embargo, tenían niveles más bajos de glucosa en la sangre, un posible indicador de estrés reducido o relacionado con el comportamiento de alimentación reducido. También se desarrolló un modelo de desafío en el que los peces se infectaron utilizando huevos del parásito, *Sciaenacotyle panceri*, para probar las propiedades terapéuticas de los aceites seleccionados.

Se realizó un experimento final para probar la eficacia de la canela como parasiticida para la corvina infestada con *S. panceri*. Se confirmó que los peces tenían parásitos antes de que comenzara el experimento. Para el experimento de tratamiento se prepararon tres dietas, una dieta no tratada, una dieta con EO de canela y una nueva dieta preparada con un extracto acuoso de Echinacea. Echinacea fue seleccionada ya que recientemente varios estudios han demostrado sus propiedades inmunoestimulantes en peces (Bulfon et al, 2017; Guz et al 2014; Oskoi et al 2012), y se decidió investigar si un inmunoestimulante beneficiaría a los peces con parásitos. Después de tres semanas, la prevalencia en cada uno de los grupos de tratamiento se muestra en la Tabla 28:

Tabla 1. Resumen de resultados.

Treatment	Prevalence (%)	Intensity (>5 ind/ gill)	Intensity (>8 ind/gill)
Control	100	15	2
Echinacea	100	15	10
Cinnamon	60	0	0

Se evaluaron los parámetros de estrés y defensa inmune, pero no se detectaron diferencias significativas entre los tratamientos. El aceite de canela también se probó in vitro y en una concentración del 0,2% en el que mató al 100% de los individuos de *S. pancerii* en 4'21 ". El aceite de canela también mostró propiedades inmunoestimulantes. En general, la canela mostró un claro potencial para tratar una parasitosis con *S. pancerii* cuando se administra por vía oral a la corvina juvenil.



6. Mercado, percepción del consumidor, nuevos productos y modelo de negocio.

(Liderado por Gemma Tacken, Wageningen University and Research, The Netherlands)

La investigación socioeconómica en DIVERSIFY incluye un enfoque de desarrollo de mercado aplicado, aclaraciones sobre la percepción de los productos de la acuicultura, evaluación de la demanda del mercado, preferencias de los consumidores, desarrollo de nuevos productos (Fig. 70), valor agregado y desarrollo del mercado. Los estudios se han realizado en cinco mercados de pescado europeos: Francia, Alemania, Italia, España y el Reino Unido.

Análisis de Mercados

Machiel Reinders, Wageningen University and Research, The Netherlands

El análisis de mercado demostró que a los compradores importantes (por ejemplo, a los minoristas) en los cinco países les resulta muy difícil posicionar a las 6 nuevas especies (por ejemplo, corvina) en relación con las especies actuales en el mercado.

Las especies como la corvina a veces se conocen como capturas silvestres, pero menos como productos acuícolas. Sin embargo, los compradores industriales no posicionan fácilmente este pescado en relación con otras especies de peces.

Los compradores están abiertos a recibir nuevas especies en las siguientes condiciones:

- El producto debe ser cultivado de forma sostenible,
- El producto debe estar disponible como producto fresco (especialmente en el sur de Europa)
- El producto debe ser fácil de preparar y / o listo para comer (Alemania y Reino Unido) y
- El producto debe tener un precio competitivo.

Desarrollo de Nuevos Productos

Marija Banovic, MAPP Centre, Department of Management, Aarhus University, Denmark; Rocio Robles, Ctaqua, Spain.

La co-creación con los consumidores identificó ideas de productos muy prometedoras para nuevos productos de pescado por país investigado.

También se identificaron los impulsores y las barreras más importantes para la elección de las nuevas ideas de productos, así como las recomendaciones para el desarrollo de nuevos productos de especies de peces seleccionadas.

Doce ideas de productos han sido evaluadas para determinar la viabilidad técnica y la vida útil, tres de ellas de corvina: ensalada lista para comer con pescado (corvina), filetes de corvina congelados divididos en porciones dobles y hamburguesa de pescado con la forma de un pescado (Fig. 70).





Figura 70. Nuevos productos de corvina desarrollados en Diversify: ensalada lista para comer con pescado (corvina) (arriba a la izquierda); Hamburguesa de pescado con la forma de un pescado (arriba a la derecha) y filetes de corvina congelados divididos en porciones dobles (abajo).

Caracterización sensorial de nuevas especies de peces y aceptación por parte del consumidor de los nuevos productos desarrollados.

Luis Guerrero, IRTA, España.

Las nuevas especies de peces deben introducirse adecuadamente para crear una diversificación en el mercado actual. Los parámetros sensoriales, de composición, de textura instrumental y las propiedades somáticas de DIVERSIFY cinco especies de peces emergentes, a saber, cherna, seriola, lisa, corvina y lucioperca, se examinaron con fines de caracterización.

En cuanto a los parámetros de composición, el contenido de grasa fue uno de los aspectos discriminatorios más relevantes entre las especies, mientras que la dureza fue una de las más diferenciadoras cuando se trató de textura.

Se describió una mayor cantidad de ámbar con sabor amargo, lucioperca se describió como un pescado blanco quebradizo, pastoso y un salmonete gris se caracterizó por un sabor amargo. La firmeza sensorial era claramente distintiva para los pecios, mientras que la corvina se relacionaba con la textura jugosa.

Las especies en este estudio exhibieron una amplia gama de características fisicoquímicas y sensoriales que muestran su potencial para ser explotadas aún más al diseñar nuevos productos.

En una prueba de aceptación del consumidor, se demostró la influencia de proporcionar la información del producto en el grado de aceptación del consumidor (Fig.71). En el caso de la corvina, se presentó como una ensalada de pescado lista para comer y una hamburguesa de pescado con la forma de un pescado. En general, los productos con un menor grado de procesamiento fueron aquellos que generaron mayor aceptación esperada y real.

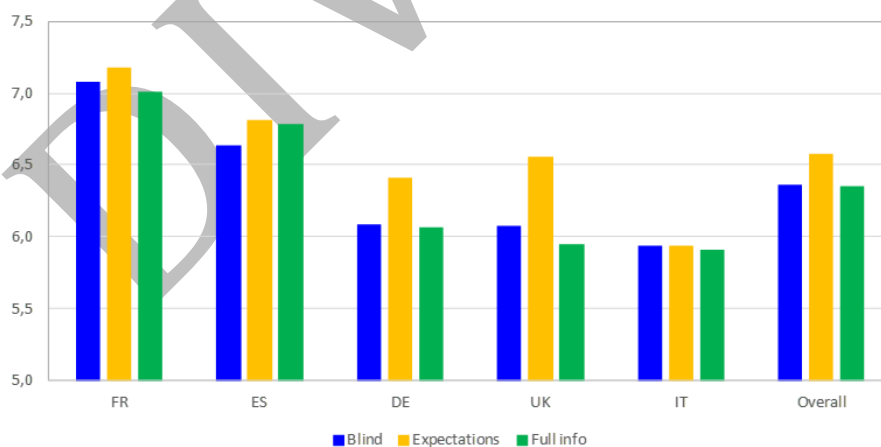


Figura 71. Resultados de las pruebas de aceptación de los consumidores para los nuevos productos desarrollados realizados en 5 países europeos. Los consumidores no fueron informados sobre el producto (barra azul), luego, al conocer el producto que se iba a probar, se les preguntó sobre sus expectativas (barra naranja) y finalmente tuvieron la información completa antes de probar el producto (barra verde).



Referencias

Reproducción y Genética

- Duncan, N.J., Estévez, A., Fernández-Palacios, H., Gairin, I., Hernández-Cruz, C.M., Roo, F.J., Schuchardt, D., Vallés, R., 2013. Aquaculture production of corvina (*Argyrosomus regius*): hatchery techniques, ongrowing and market, in: Allan, G., Burnell, G. (Eds.), *Advances in Aquaculture Hatchery Technology*. Woodhead Publishing Limited, Cambridge, UK, pp. 519-541.
- Duncan, N.J., Mylonas, C.C., Milton Sullon, E., Karamanlidis, D., França Nogueira, M.C., Ibarra-Zatarain, Z., Chiumento, M., Aviles Carrillo, R.O., 2018. Paired spawning with male rotation of corvina *Argyrosomus regius* using GnRH α injections, as a method for producing multiple families for breeding selection programs. *Aquaculture* 495, 506-512.
- FAO, 2012. *The State of World Fisheries and Aquaculture: 2012*. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome.
- Gil, M.D.M., Grau, A., Basilone, G., Ferreri, R., Palmer, M., 2013. Reproductive strategies and fecundity of corvina *Argyrosomus regius* Asso, 1801 (Pisces: Sciaenidae): implications for restocking programs. *Scientia Marina* 77, 105-118.
- González-Quirós, R., del Árbol, J., García-Pacheco, M., Silva-García, J., Naranjo, J.M., Morales-Nin, B., 2011. Life-history of the corvina *Argyrosomus regius* in the Gulf of Cadiz (SW Iberian Peninsula). *Fisheries Research* 109, 140-149.
- Haffray, P., Malha, R., Sidi, M.O.T., Prista, N., Hassan, M., Castelnaud, G., Karahan-Nomm, B., Gamsiz, K., Sadek, S., Bruant, J.S., Balma, P., Bonhomme, F., 2012. Very high genetic fragmentation in a large marine fish, the corvina *Argyrosomus regius* (Sciaenidae, Perciformes): impact of reproductive migration, oceanographic barriers and ecological factors. *Aquatic Living Resources* 25, 173-183.
- Monfort, M.C., 2010. Present market situation and prospects of corvina (*Argyrosomus regius*), as an emerging species in Mediterranean aquaculture, *Studies and Reviews*. General Fisheries Commission for the Mediterranean No. 89. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Roma, pp. 28.
- Mylonas, C.C., Sigelaki, I., Divanach, P., Mananos, E., Carrillo, M., Afonso-Polyviou, A., 2003. Multiple spawning and egg quality of individual European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) females after repeated injections of GnRH α . *Aquaculture* 221, 605-620.
- Mylonas, C.C., Mitrizakis, N., Castaldo, C.A., Cerviño, C.P., Papadaki, M., Sigelaki, I., 2013a. Reproduction of hatchery-produced corvina *Argyrosomus regius* in captivity II. Hormonal induction of spawning and monitoring of spawning kinetics, egg production and egg quality. *Aquaculture* 414-415, 318-327.
- Mylonas, C.C., Mitrizakis, N., Papadaki, M., Sigelaki, I., 2013b. Reproduction of hatchery-produced corvina *Argyrosomus regius* in captivity I. Description of the annual reproductive cycle. *Aquaculture* 414-415, 309-317.
- Mylonas, C.C., Fatira, E., Karkut, P., Sigelaki, I., Papadaki, M., Duncan, N., 2015. Reproduction of hatchery-produced corvina *Argyrosomus regius* in captivity III. Comparison between GnRH α implants and injections on spawning kinetics and egg/larval performance parameters. *Aquaculture* 448, 44-53.
- Mylonas, C.C., Salone, S., Biglino, T., de Mello, P.H., Fakriadis, I., Sigelaki, I., Duncan, N., 2016. Enhancement of oogenesis/spermatogenesis in corvina *Argyrosomus regius* using a combination of temperature control and GnRH α treatments. *Aquaculture* 464, 323-330.
- Papadakis, I., Kentouri, M., Divanach, P., Mylonas, C.C., 2013. Ontogeny of the digestive system of corvina *Argyrosomus regius* reared in a mesocosm, and quantitative changes of lipids in the liver from hatching to juveniles. *Aquaculture* 388-391, 76-88.



- Roo, J., Hernandez-Cruz, C.M., Borrero, C., Schuchardt, D., Fernandez-Palacios, H., 2010. Effect of larval density and feeding sequence on corvina (*Argyrosomus regius*; Asso, 1801) larval rearing. *Aquaculture* 302, 82- 88.
- Saillant, E., Chatain, B., Fostier, A., Przybyla, C., Fauvel, C., 2001. Parental influence on early development in the European sea bass. *Journal of Fish Biology* 58.
- Vallés, R., Estévez, A., 2015. Effect of different enrichment products rich in docosahexaenoic acid on growth and survival of corvina, *Argyrosomus regius* (Asso, 1801). *Journal of the World Aquaculture Society* 46, 191-200.

Salud de los peces

- C. Campoverde, D. J. Milne, A. Estevez, N. Duncan, C. J. Secombes, K. B. Andree (2017) Ontogeny and modulation after PAMPs stimulation of b-defensin, hepcidin, and piscidin antimicrobial peptides in corvina (*Argyrosomus regius*). *Fish & Shellfish Immunology*, 69: 200-210.
- A Elkesh, K P L Kantham, A P Shinn, M Crumlish and R H Richards (2012) Systemic nocardiosis in a Mediterranean population of cultured corvina, *Argyrosomus regius* Asso (Perciformes: Sciaenidae). *J. Fish Dis.* Pp. 1-9, doi:10.1111/jfd.12015
- Paolo Merella, Santino Cherchi, Giovanni Garippa, Maria Letizia Fioravanti, Andrea Gustinelli, Fulvio Salati (2009) Outbreak of *Sciaenacotyle panceri* (Monogenea) on cage-reared corvina *Argyrosomus regius* (Osteichthyes) from the western Mediterranean Sea *Dis Aquat Org* Vol. 86: 169–173, 2009 doi: 10.3354/dao02115
- D.J. Milne, C. Campoverde, K.B. Andree, X. Chen, J. Zou, C.J. Secombes (2018) The discovery and comparative expression analysis of three distinct type I interferons in the perciform fish, corvina (*Argyrosomus regius*). *Developmental and Comparative Immunology*, 84: 123e132
- D. J. Milne, C. Campoverde, K.B. Andree, J. Zou, C.J. Secombes (2017) Two types of TNF α in corvina (*Argyrosomus regius*): Discovery, distribution and expression modulation. *Molecular Immunology*, 92: 136–145.
- F. Soares, A. Roque, P. J. Gavaia (2018) Review of the principal diseases affecting cultured corvina (*Argyrosomus regius*). *Aquaculture Research*.49:1373–1382.
- S Ternengo, S Agostini, Y Quilichini, L Euzet and B Marchand (2010) Intensive infestations of *Sciaenocotyle pancerii* (Monogenea, Microcotylidae) on *Argyrosomus regius* (Asso) under fish-farming conditions *Journal of Fish Diseases*, 33, 89–92 doi:10.1111/j.1365-2761.2009.01094.x
- Alasalvar, C., Taylor, K.D., Zubcov, E., Shahidi, F., Alexis, M., 2002. Differentiation of cultured and wild sea bass (*Dicentrarchus labrax*): total lipid content, fatty acid and trace mineral composition. *Food Chem.* 79, 145–150.
- Baily, J.E., Bretherton, M.J., Gavine, F.M., Ferguson, H.W., Turnbull, J.F., 2005. The pathology of chronic erosive dermatopathy in Murray cod, *Maccullochella peelii peelii* (Mitchell). *J. Fish Dis.* 28, 3–12. doi:10.1111/j.1365-2761.2004.00586.x
- Bennett, H.S., Wyrick, A.D., Lee, S.W., McNeil, J.H., 1976. Science and art in preparing tissues embedded in plastic for light microscopy, with special reference to glycol methacrylate, glass knives and simple stains. *Stain Technol.* 51, 71–97.
- Bleckmann, H., Zelick, R., 2009. Lateral line system of fish. *Integr. Zool.* 4, 13–25.
- Corrales, J., Ullal, A., Noga, E.J., 2009. Lateral line depigmentation (LLD) in channel catfish, *Ictalurus punctatus* (Rafinesque). *J. Fish Dis.* 32, 705–712. doi:10.1111/j.1365-2761.2009.01069.x
- Dagamseh, A., Wiegerink, R., Lammerink, T., Krijnen, G., 2013. Imaging dipole flow sources using an artificial lateral-line system made of biomimetic hair flow sensors. *J. R. Soc Interface* 10, 1–9.
- Eisler, R., Gardner, G.R., 1973. Acute toxicology to an estuarine teleost of mixtures of cadmium, copper and zinc salts. *J. Fish Biol.* 5, 131–142.
- Kalantzi, I., Black, K.D., Pergantis, S.A., Shimmield, T.M., Papageorgiou, N., Sevastou, K., Karakassis,



- I., 2013. Metals and other elements in tissues of wild fish from fish farms and comparison with farmed species in sites with oxic and anoxic sediments. *Food Chem.* 141, 680–694.
- Kalantzi, I., Pergantis, S.A., Black, K.D., Shimmield, T.M., Papageorgiou, N., Tsapakis, M., Karakassis, I., 2016. Metals in tissues of seabass and seabream reared in sites with oxic and anoxic substrata and risk assessment for consumers. *Food Chem.* 194, 659–670.
- Katharios, P., Papadaki, M., Ternengo, S., Kantham, P.K., Zeri, C., Petraki, P.E., Divanach, P., 2011. Chronic ulcerative dermatopathy in cultured marine fishes. Comparative study in sharpnose sea bream, *Diplodus puntazzo* (Walbaum). *J. Fish Dis.* 34, 459–474.
- Rigos, G., Katharios, P., 2010. Pathological obstacles of newly-introduced fish species in Mediterranean mariculture: A review. *Rev. Fish Biol. Fish.* 20, 47–70.
- Schultz, A.G., Healy, J.M., Jones, P.J., Toop, T., 2008. Osmoregulatory balance in Murray cod, *Maccullochella peelii peelii* (Mitchell), affected with chronic ulcerative dermatopathy. *Aquaculture* 280, 45–52.
- Schultz, A.G., Jones, P.L., Toop, T., 2014. Rodlet cells in Murray cod, *Maccullochella peelii peelii* (Mitchell), affected with chronic ulcerative dermatopathy. *J. Fish Dis.* 37, 219–228. doi:10.1111/jfd.12099
- Schultz, A.G., Shigdar, S.L., Jones, P.L., Ward, A.C., Toop, T., 2011. Groundwater pre-treatment prevents the onset of chronic ulcerative dermatopathy in juvenile Murray cod, *Maccullochella peelii peelii* (Mitchell). *Aquaculture* 312, 19–25. doi:10.1016/j.aquaculture.2010.12.013
- Tarby, M.L., Webb, J.F., 2003. Development of the supraorbital and mandibular lateral line canals in the cichlid, *Archocentrus nigrofasciatus*. *J. Morphol.* 255, 44–57. doi:10.1002/jmor.10045
- Wada, H., Iwasaki, M., Kawakami, K., 2014. Development of the lateral line canal system through a bone remodeling process in zebrafish. *Dev. Biol.* 392, 1–14.
- Webb, J.F., 1989. Neuromast morphology and lateral line trunk canal ontogeny in two species of cichlids: an SEM study. *J. Morphol.* 202, 53–68. doi:10.1002/jmor.1052020105
- Webb, J.F., Shirey, J.E., 2003. Postembryonic Development of the Cranial Lateral Line Canals and Neuromasts in Zebrafish. *Dev. Dyn.* 228, 370–385. doi:10.1002/dvdy.10385
- Zotos, A., Vouzanidou, M., 2012. Seasonal changes in composition, fatty acid, cholesterol and mineral content of six highly commercial fish species of Greece. *Food Sci. Technol. Int.* 18, 139–49.
- Alasalvar, C., Taylor, K.D., Zubcov, E., Shahidi, F., Alexis, M., 2002. Differentiation of cultured and wild sea bass (*Dicentrarchus labrax*): total lipid content, fatty acid and trace mineral composition. *Food Chem.* 79, 145–150.
- Baily, J.E., Bretherton, M.J., Gavine, F.M., Ferguson, H.W., Turnbull, J.F., 2005. The pathology of chronic erosive dermatopathy in Murray cod, *Maccullochella peelii peelii* (Mitchell). *J. Fish Dis.* 28, 3–12. doi:10.1111/j.1365-2761.2004.00586.x
- Bennett, H.S., Wyrick, A.D., Lee, S.W., McNeil, J.H., 1976. Science and art in preparing tissues embedded in plastic for light microscopy, with special reference to glycol methacrylate, glass knives and simple stains. *Stain Technol.* 51, 71–97.
- Bleckmann, H., Zelick, R., 2009. Lateral line system of fish. *Integr. Zool.* 4, 13–25.
- Corrales, J., Ullal, A., Noga, E.J., 2009. Lateral line depigmentation (LLD) in channel catfish, *Ictalurus punctatus* (Rafinesque). *J. Fish Dis.* 32, 705–712. doi:10.1111/j.1365-2761.2009.01069.x
- Dagamseh, A., Wiegerink, R., Lammerink, T., Krijnen, G., 2013. Imaging dipole flow sources using an artificial lateral-line system made of biomimetic hair flow sensors. *J. R. Society Interface* 10, 1–9.
- Eisler, R., Gardner, G.R., 1973. Acute toxicology to an estuarine teleost of mixtures of cadmium, copper and zinc salts. *J. Fish Biol.* 5, 131–142.
- Kalantzi, I., Black, K.D., Pergantis, S.A., Shimmield, T.M., Papageorgiou, N., Sevastou, K., Karakassis, I., 2013. Metals and other elements in tissues of wild fish from fish farms and comparison with farmed species in sites with oxic and anoxic sediments. *Food Chem.* 141, 680–694.
- Kalantzi, I., Pergantis, S.A., Black, K.D., Shimmield, T.M., Papageorgiou, N., Tsapakis, M., Karakassis, I., 2016. Metals in tissues of seabass and seabream reared in sites with oxic and anoxic substrata and risk assessment for consumers. *Food Chem.* 194, 659–670.
- Katharios, P., Papadaki, M., Ternengo, S., Kantham, P.K., Zeri, C., Petraki, P.E., Divanach, P., 2011. Chronic ulcerative dermatopathy in cultured marine fishes. Comparative study in sharpnose sea



- bream, *Diplodus puntazzo* (Walbaum). J. Fish Dis. 34, 459–474.
- Rigos, G., Katharios, P., 2010. Pathological obstacles of newly-introduced fish species in Mediterranean mariculture: A review. Rev. Fish Biol. Fish. 20, 47–70.
- Schultz, A.G., Healy, J.M., Jones, P.J., Toop, T., 2008. Osmoregulatory balance in Murray cod, *Maccullochella peelii peelii* (Mitchell), affected with chronic ulcerative dermatopathy. Aquaculture 280, 45–52.
- Schultz, A.G., Jones, P.L., Toop, T., 2014. Rodlet cells in Murray cod, *Maccullochella peelii peelii* (Mitchell), affected with chronic ulcerative dermatopathy. J. Fish Dis. 37, 219–228. doi:10.1111/jfd.12099
- Schultz, A.G., Shigdar, S.L., Jones, P.L., Ward, A.C., Toop, T., 2011. Groundwater pre-treatment prevents the onset of chronic ulcerative dermatopathy in juvenile Murray cod, *Maccullochella peelii peelii* (Mitchell). Aquaculture 312, 19–25. doi:10.1016/j.aquaculture.2010.12.013
- Tarby, M.L., Webb, J.F., 2003. Development of the supraorbital and mandibular lateral line canals in the cichlid, *Archocentrus nigrofasciatus*. J. Morphol. 255, 44–57. doi:10.1002/jmor.10045
- Wada, H., Iwasaki, M., Kawakami, K., 2014. Development of the lateral line canal system through a bone remodeling process in zebrafish. Dev. Biol. 392, 1–14.
- Webb, J.F., 1989. Neuromast morphology and lateral line trunk canal ontogeny in two species of cichlids: an SEM study. J. Morphol. 202, 53–68. doi:10.1002/jmor.1052020105
- Webb, J.F., Shirey, J.E., 2003. Postembryonic Development of the Cranial Lateral Line Canals and Neuromasts in Zebrafish. Dev. Dyn. 228, 370–385. doi:10.1002/dvdy.10385
- Zotos, A., Vouzanidou, M., 2012. Seasonal changes in composition, fatty acid, cholesterol and mineral content of six highly commercial fish species of Greece. Food Sci. Technol. Int. 18, 139–49.

Destete

- Durán, J., Pastor, E., Grau, A., Massuti-Pascual, E., Valencia, J.M., Gil, M.M. 2009. Total replacing or Artemia by an artificial diet in larval rearing feeding protocol of corvina (*Argyrosomus regius*, Asso, 1801). Aquaculture Europe, Trondheim August 14-17, 2009. EAS Spec. Publi, 38
- Papadakis, I.E., Kentouri, M., Divanach, P., Mylonas, C.C. 2013. Ontogeny of the digestive system of corvina *Argyrosomus regius* reared in a mesocosm, and quantitative changes of lipids in the liver from hatching to juvenile. Aquaculture, 388-391: 76-88
- Person-Le Ruyet, J., 1990. Early weaning of marine fish larvae. onto microdiets: constraints and perspectives. In: Advances in Tropical Aquaculture (Barret, J. ed.), pp. 625–642. IFREMER, Actes de Colloque 9. Tahiti, French Polynesia.
- Person-Le-Ruyet, J., Alexandre, J.C., Thébaud, L. and Mugnier, C., 1993. Marine fish larvae feeding: Formulated diets or live prey?. J. World Aquacult. Soc., 24: 211–224
- Roo, J., Hernández-Cruz, C.M., Borrero, C., Schuchardt, D., Fernandez-Palacios, H., 2010. Effect of larval density and feeding sequence on corvina (*Argyrosomus regius*, Asso, 1801) larval rearing. Aquaculture, 302: 82-88
- Suzer, C., Kamaci, H.O., Coban, D., Firat, K., Saka, S., 2013. Functional changes in digestive enzyme activities of corvina (*Argyrosomus regius*, Asso, 2801) during early ontogeny. Fish Physiol. Biochem., 39: 967-977
- Vallés, R. and Estevez, A., 2013. Light conditions for larval rearing of corvina (*Argyrosomus regius*). Aquaculture, 376-379: 15-19
- Vallés, R. and Estevez, A., 2015. Effect of different enrichment products rich in docosahexaenoic acid on growth and survival of corvina, *Argyrosomus regius* (Asso, 1801). Journal of the World Aquaculture Society, 42: 191-200



Directora de diseminación: Dra Rocio Robles, CT AQUA, r.robles@ctaqua.es

Coordinador del proyecto: Dr Constantinos C Mylonas, HCMR, mylonas@hcmr.gr



Co-funded by the Seventh
Framework Programme
of the European Union



Este proyecto de 5 años (2013-2018) ha recibido fondos del Séptimo Programa Marco de la Unión Europea para investigación, desarrollo tecnológico y demostración (KBBE-2013-07, etapa única, GA 603121, DIVERSIFY). El consorcio incluye a 38 socios de 12 países europeos, entre ellos 9 pymes, 2 grandes empresas, 5 asociaciones profesionales y 1 ONG de consumidores, y está coordinado por el Centro Helénico de Investigación Marina de Grecia. Se puede obtener más información en el sitio del proyecto en "www.diversifyfish.eu".