

# **Implantación del sistema de marcaje V.I.E. (Visible Implant Elastomer) en la mejora genética de dorada (*Sparus aurata*).**

N. Astorga<sup>1</sup>, M.J. Zamorano<sup>1</sup>, D. Montero<sup>2</sup>, H. Fernández-Palacios<sup>2</sup>, V. Oliva<sup>1</sup>, J.M.Afonso<sup>1</sup>.

<sup>1</sup> Universidad de Las Palmas de Gran Canaria-Facultad de Veterinaria. Trasmontaña 35416, Arucas, Las Palmas.

<sup>2</sup> Instituto Canario de Ciencias Marinas, P.O.Box 56, 35200, Telde, Las Palmas.

## **RESUMEN**

En el presente estudio se evalúa la validez del sistema de marcaje interno y fluorescente V.I.E., de Northwest Marine Technology (Shaw Island, Washington), en doradas de 7 a 18 gramos, considerando cuatro colores (rojo, verde, naranja y amarillo), tres posiciones corporales (lomo dorsal, lomo medio y cola) y dos orientaciones (horizontal y vertical). El tiempo medio de marcaje por pez fue de 15,7 segundos. La mortalidad fue nula en la primera semana, y de un 4% durante todo el experimento pero nunca asociada al método de marcaje. El color de más fácil percepción fue el rojo. Hubo efecto significativo de la orientación sobre la longitud, la anchura, el fraccionamiento y la intensidad de la marca, siendo los implantes horizontales los recomendables por su bajo fraccionamiento, presentar una mayor intensidad y posibilitar dobles marcas. No hubieron diferencias de crecimiento entre peces no marcados, como control, y peces marcados con el sistema V.I.E. El coste económico de cada marca fue de 0,065 dólares.

## **INTRODUCTION**

En los programas de mejora genética de peces el conocimiento de la genealogía mediante la cría separada de las familias requiere de grandes instalaciones y un control preciso de la reproducción que permita establecer tanto familias de medios hermanos como de hermanos carnales. Dorada es una especie proterándrica que presenta puesta durante 4 ó 5 meses y porcentajes crecientes de larvas vivas bajo puestas masales. Knibb *et al.* (1998), encontraron que los éxitos de las puestas (en porcentaje de descendientes viables) por masaje abdominal y a partir de familias de hermanos carnales y medios hermanos fueron del orden de 10%, 22% y 43%, respectivamente. Todo esto, hace que la puestas masales y/o cría conjunta sean práctica habitual durante la reproducción de dorada, lo que permite a su vez evitar las fuentes de parecido debido al ambiente común que comparten los peces de una familia durante su crecimiento. Es más, Herbinger *et al.* (1999) estimaron en alrededor de un 13% la varianza del ambiente común para el peso a los 8 meses de edad en salmón del Atlántico, después de comparar los crecimientos de las descendencias de la mismas familias en cría conjunta y separada. Sin embargo, la cría conjunta y temprana de los peces de distintas familias requiere de sistemas de marcaje que permitan reconocer los individuos y el origen familiar de los mismos en el momento de valorar los criterios de selección y estimar los parámetros genéticos. El uso combinado de marcadores genéticos y sistemas físicos de marcaje (internos y/o externos) permite optimizar la precisión de estimas y dar otras alternativas dentro de la valoración.

Los marcadores externos para la identificación individual o grupos de animales tienen las ventajas de ser económicos, fáciles y rápidos de colocar, y requieren una tecnología de aplicación simple. Estos marcadores tienen el inconveniente de que pueden afectar al crecimiento, la salud y la supervivencia, debido a su penetración en la piel, favoreciendo las infecciones por el movimiento y roce del marcador sobre la misma. Por el contrario, los marcadores internos, los cuales son insertados o inyectados dentro del pez, tienen un efecto biológico pequeño sobre el crecimiento, la salud y la supervivencia de los peces, habiendo sido utilizados con éxito en un amplio rango de tallas y especies, aunque en algunos casos requieren de sistemas de aplicación y de detección caros que pueden producir grandes tasas de pérdidas de las marcas. El *Visual Implant Elastomer* (V.I.E.) es un método de identificación interno de la compañía Northwest Marine Technology Inc. (Shaw Island, Washington), que es rápido de implantar y relativamente económico. Ha sido utilizado con éxito en *Lepomis macrochirus* (Dewey y Zigler, 1996), en peces de arrecife (Frederick, 1997) y en especies de salmónidos como *Oncorhynchus clarki* y *Salvelinus confluentus* (Bonneau et al., 1995), *Oncorhynchus kisutch* (Bailey et al., 1998) y *Salvelinus fontinalis* (Hughes et al., 2000). En espáridos, sólo ha sido utilizado en membranas interradales de *Pagrus auratus* con el fin de valorar la distancia de identificación según el color y las tasas de retención y mortalidad, para estudios ecológicos (Willis y Babcock, 1998).

La dorada es una especie para la cual no existe documentación alguna referente a sistemas de marcaje ni internos ni externos, aunque en el Instituto Canario de Ciencias Marinas ya se han utilizado con éxito los *PIT tags* (*Passive Integrated Transponder*) para adultos durante el desarrollo de los proyectos titulados Mejora genética para tolerancia al estrés (FAIR-CT95-0152) y Selección de reproductores para tolerancia al estrés (MAR96-2535-C02-01-CE) (Afonso et al., 1998). En el presente estudio evaluamos el sistema de marcaje V.I.E. a tallas pequeñas de dorada considerando cuatro tipos de colores, dos tipos de orientación y tres ubicaciones corporales, a la vez que sus tasas de retención. También se valora la influencia de la marca sobre la tasa de supervivencia y el crecimiento de los peces.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Un total de 375 alevines fueron criados de modo intensivo durante 45 días en el Instituto Canario de Ciencias Marinas, desde el 25 de junio de 2001. Los peces fueron criados con dietas comerciales de la compañía Proaqua S.A., distribuidos en ocho tanques con un promedio de 45 peces por cada uno y a una densidad de  $1,659 \pm 0,037$   $\text{kg}\cdot\text{m}^{-3}$ . Al comienzo del experimento el peso medio fue de  $7,52 \pm 0,09$  gramos y los peces fueron anestesiados con MS-222 y marcados individualmente, por la misma persona, con el sistema *Visible Implant Fluorescent Elastomer* (VIE) usando una jeringa y siguiendo las recomendaciones de la empresa Northwest Marine Technology, Inc. (Shaw Island, Washington). Para el marcaje simple de cada pez se utilizaron unos 5  $\mu\text{l}$  de resina, lo que supone un costo por marca de 0,065 dólares. Como control del crecimiento se utilizó un tanque adicional de peces no marcados.

Se utilizaron cuatro colores fluorescentes (rojo, naranja, amarillo y verde) en tres localizaciones corporales: (1) lado izquierdo cerca del opérculo, denominado lomo dorsal anterior, (2) lado izquierdo bajo la aleta dorsal, denominado lomo dorsal medio en el documento y (3) lado izquierdo del pedúnculo caudal, denominado cola en el documento, todos en posición horizontal y vertical. Además, fueron evaluados el tiempo de aplicación, la tasa de retención y el efecto sobre la supervivencia. Para ello, los peces fueron capturados y examinados bajo luz ultravioleta. Al inicio del

experimento se midió tanto el largo como el ancho de los implantes en 30 peces escogidos al azar con marca en orientación horizontal y otros 30 peces con orientación vertical. Al final del experimento, todos los peces fueron pesados, medidos y evaluados para la longitud, el ancho, el fraccionamiento y la intensidad de la marca.

Los datos fueron analizados mediante el programa SPSS (v10.0) usando el siguiente modelo lineal con la orientación y la localización como efectos fijos y el peso como covariable:

$$Y_{ijk} = m + a_i + d_j + (ad)_{ij} + bX_{ijk} + e_{ijk}$$

donde  $Y_{ijk}$  fue el valor individual del pez,  $m$  la media de la población,  $a_i$  el efecto del efecto fijo de la orientación  $i$ -ésima de la marca,  $d_j$  el efecto del efecto fijo de la localización  $j$ -ésima de la marca,  $(ad)_{ij}$  la interacción entre ambos factores,  $bX_{ijk}$  la regresión de las diferentes variables sobre el peso del pez y  $e_{ijk}$  el error residual del  $ijk$ -ésimo registro.

## RESULTADOS

### Colores, crecimiento y mortalidad

Bajo la acción de la luz ultravioleta, el orden en el que los colores se distinguieron fácilmente fue rojo, verde, naranja y amarillo. Los dos más difíciles de apreciar fueron naranja y amarillo, puesto que el naranja se lee como un amarillo incandescente mientras que el amarillo se observa como verde lima. Cuando las marcas se observaban a simple vista, los más fáciles de distinguir fueron el rojo y el amarillo, por lo que serían los colores recomendables para el marcaje en experimentos donde es difícil utilizar luz ultravioleta, por su efecto en los resultados, como es el caso de los experimentos de comportamiento.

No hubo mortalidad en la primera semana después de realizados los marcajes. La mortalidad apreciada del 4% durante los 45 días del experimento no se distinguió de la del tanque control, al igual que sucedió con el crecimiento, y nunca estuvo asociada al daño físico que supuso la manipulación y la penetración del implante en peces de 7 gramos.

### Tiempo de aplicación de la marca

Para valorar el efecto de la orientación de la marca sobre el tiempo que requiere marcar un pez (es decir, desde coger un individuo, manipularlo, introducirle el implante y depositarlo nuevamente en el tanque), se cuantificó el tiempo de marcaje en 60 peces escogidos al azar de entre los 375 utilizados en el experimento, 30 con orientación horizontal y 30 con orientación vertical. Como promedio, e independientemente de la orientación de la marca, se necesitaron 15,7 segundos, siendo de 15,8 segundos para marcas horizontales y 15,6 segundos para marcas verticales. Con esta velocidad de marcaje se pueden marcar al menos unos 229 peces por hora.

### **Longitud y ancho de la marca**

Al inicio del experimento, el implante horizontal presentó diferencias, estadísticamente significativas, frente al implante vertical, tanto para la longitud como para el ancho de la marca. La longitud media fue de 0,871cm, aunque en los implantes horizontales fue de  $0,945 \pm 0,088$  cm frente a  $0,797 \pm 0,025$  cm de los implantes verticales ( $P < 0.05$ ). Estas diferencias fueron debidas en parte a la correlación que existe entre las longitudes del implante y del pez, que fueron de 0,62 para los implantes horizontales y de 0,19 para los implantes verticales, si bien en estos últimos la correlación se hizo utilizando el peso del pez al no medirse la altura del mismo. En relación a la anchura del implante, esta fue mayor en el horizontal que en el vertical,  $0,090 \pm 0,034$  cm frente a  $0,066 \pm 0,0024$  cm ( $P < 0.001$ ), respectivamente.

Al final del experimento, la longitud media fue de 0,961cm, siendo de 1,111 cm para el lomo dorsal medio, 0,928 cm para el lomo dorsal anterior y 0,838 cm para la cola. Las marcas verticales fueron más largas que las horizontales, 1,011 cm frente a 0,91 cm, mientras que al inicio del experimento los valores eran al contrario, 0,797cm para verticales frente a 0,945 cm para horizontales. Hubo efecto significativo de la orientación, del sitio y de la interacción entre ambas para la longitud de la marca, con unos porcentajes de variación del 0,4%, 16,9% y 16,4% respectivamente. A pesar de que el sitio y su interacción con la orientación explican mucho más que la orientación por sí misma, la interacción se debe esencialmente al valor de la longitud en la posición lomo dorsal medio en la orientación vertical, que fue de 1,262 cm, ya que en un análisis donde no se considere el sitio lomo dorsal medio sólo se mantiene el efecto significativo del sitio (tabla 1).

**Tabla 1.** Valores de longitudes de los implantes V.I.E. considerando el sitio y la orientación de los mismos.

<b>ORIENTACION</b>	<b>SITIO</b>		
	<b>Lomo dorsal anterior</b>	<b>Lomo dorsal medio</b>	<b>Cola</b>
<b>Horizontal</b>	0,930	0,970	0,832
<b>Vertical</b>	0,926	1,262	0,844

Concerniente a la anchura de los implantes, con una dimensión promedio de 0,12 cm, sólo hubo efecto significativo de la orientación, la cual explica un 52,1% de la variación total. Las marcas verticales fueron 1,8 veces más anchas que las horizontales (0,154 cm frente a 0,085 cm), a pesar de que los implantes en orientación vertical eran más delgados que los horizontales al inicio del experimento ( $0,066$  cm frente a  $0,090$  cm para verticales y horizontales, respectivamente).

### **Fraccionamiento e intensidad de la marca**

Durante el crecimiento de los peces los implantes se fueron fraccionando, lo cual generó cierta dificultad a la hora del reconocimiento al existir una disminución de la densidad en la marca. El fraccionamiento fue significativamente mayor en marcas verticales que en horizontales, 6,52 frente a 2,88 fragmentos respectivamente, no habiendo influencia del sitio en el que se ubicara (4,4 fragmentos en lomo dorsal anterior, 5,1 fragmentos en lomo dorsal medio y 4,5 fragmentos en cola). La orientación fue el factor que explicó la mayor parte de la variación, un 73,1%.

Al final del experimento, las marcas también fueron valoradas visualmente para el nivel de intensidad, utilizando como testigo un pez marcado en el momento del análisis. Se detectó efecto significativo de la orientación independientemente de la posición de la marca, siendo la orientación horizontal 1,26 más intensa que la vertical. La orientación explicó el 31% de la variación total, la cual no fue debida a la longitud de la marca, al ser el valor de la correlación entre ambas del 4,1% y negativa.

## DISCUSIÓN

De los colores fluorescentes utilizados en este estudio, el rojo fue el que mejor se distinguió, tanto bajo la acción de luz ultravioleta como de luz natural, lo que concuerda con los resultados encontrados por Willis y Babcock (1998) en el espárido *Pagrus auratus*, en el que detectaron más fácilmente el rojo y el naranja frente al verde y el amarillo.

Respecto a las mortalidades asociadas al uso de marcadores físicos, estas se producen principalmente en los primeros días post-implantación. El sistema V.I.E. normalmente conlleva bajas tasas de mortalidad (Dewey y Zigler, 1996; Willis y Babcock, 1998), si bien Frederick (1997), en peces de arrecife, tuvo mortalidades del 13% dentro de las primeras 24 horas. En nuestro experimento, no hubo mortalidad alguna durante la primera semana y la que sucedió a lo largo del mismo nunca estuvo asociada al sistema de marcaje V.I.E.. La ausencia de mortalidad relacionada al sistema V.I.E. en el presente trabajo, parece que ha sido debida a la superficialidad de los implantes (subcutánea), al bajo estrés que produce en esta especie y a que todos los implantes fueron realizados por el mismo experimentador. Además, tanto en este trabajo como en los estudios realizados en otras especies, el sistema V.I.E. no tiene efecto negativo sobre el crecimiento de los peces (Dewey y Zigler, 1996; Bailey et al., 1998).

El número de peces que pueden ser marcados con el sistema V.I.E. depende de la habilidad del experimentador, de la cantidad de resina que se implante y de la continuidad en la aplicación de implantes. Dewey y Zigler (1996) y Bailey et al. (1998) necesitaron de sólo 12 segundos por marca y pez, lo que da un volumen de marcaje de 300 peces por hora. En nuestro estudio requerimos más tiempo, 15,7 segundos, si bien la longitud de nuestros implantes fueron de 3 a 9 veces más largos, lo que asegura una menor pérdida de la marca. Así, la tasa de pérdida de la marca en el presente trabajo fue nula, mientras que Bailey et al. (1998) tuvieron una tasa del 5% en las primeras 24 horas. En juveniles de *Lepomis macrochirus*, Dewey y Zigler (1996), obtuvieron una tasa de pérdida entorno al 1,5%, mientras que Hale y Gray (1998), en trucha arco iris, obtuvieron un 4,9% entre los 24 y 30 días después de realizado el implante. Willis y Babcock (1998), encontraron una tasa de pérdida del 6,6% en adultos de otro espárido, *Pagrus auratus*.

El hecho de que las marcas horizontales fuesen algo más pequeñas al final que al inicio del experimento puede haberse debido a una mayor pérdida de la resina en esta disposición. En este sentido cabe decir que las marcas en posición horizontal fueron siempre más superficiales, como denota el efecto significativo de la profundidad (intensidad) de la marca según la orientación y sin efecto del sitio, pues en el marcaje horizontal es mucho más fácil hacer el implante subcutáneo, con la consiguiente pérdida de la misma durante el desarrollo. Por el contrario, en la marca vertical la profundidad del implante fue mayor lo que impediría más su pérdida, a pesar de que en dicha disposición era más frecuente atravesar la piel por los dos extremos por las formas convexas de los flancos del pez. Además, el mayor incremento de la longitud

de las marcas cuando están dispuestas en sentido vertical, está relacionado con un mayor crecimiento alométrico del pez a lo alto que a lo largo, puesto que en dorada el coeficiente de alometría entre la altura y la longitud forquial es de 1,028 (Ginés, 1997).

En relación a las diferencias estadísticamente significativas para el ancho de las marcas, al inicio del experimento, estas fueron debidas a un doble condicionante. A la mayor incomodidad que supuso el marcar peces en sentido vertical, lo que impedía hacer menor presión sobre la jeringa del sistema manual V.I.E.. En el implante horizontal la facilidad para acomodar el pez en la mano era mucho mayor permitiendo, paradójicamente, más irregularidad de la cantidad de resina dosificada, como denota el mayor error en los implantes horizontales que en los verticales.

Por otro lado, el hecho de que los implantes verticales fuesen más anchos que los horizontales, al final del experimento, con un aumento del 33% para verticales y 6% para horizontales, dificultaría la posibilidad de dobles marcas en una misma región corporal, ya que permite la confusión entre marcajes simples y dobles. La marca vertical es la que sufre una mayor modificación de su morfología respecto al momento inicial. En este sentido consideramos, que para las tallas utilizadas en el presente trabajo, sólo sería recomendable el implante doble y vertical si se respeta una distancia mínima de 0,11 cm entre marcas.

La fragmentación de las marcas aumentó con la longitud de las mismas ( $r=0,39$ ,  $P<0,001$ ), lo que era de esperar si se tiene en cuenta que el crecimiento muscular debe fraccionar la resina del marcaje. Sin embargo, el fraccionamiento tiene que ver más con la forma de crecer el músculo del pez que con la longitud de la marca en sí misma, ya que aunque fue mayor el número de fracciones en marcas verticales, la distancia media de las fracciones en las marcas horizontales fue mayor que las marcas verticales.

En cuanto a las diferencias de intensidad entre marcas verticales y horizontales, más que indicar un deterioro de la fluorescencia en la resina, reflejan la superficialidad del implante, la cual fue más una función directa de cómo se realizó éste al inicio del experimento. Bailey et al. (1998) también encontró variabilidad en la visualización de las marcas según la profundidad de su implante. Al inicio del nuestro estudio, los implantes verticales quedaron más insertados bajo el músculo que los implantes horizontales, debido quizás al ángulo de inserción que obligó a tomar la forma del pez durante la punción. Cabe señalar que en ese momento los peces eran pequeños, y la marca tan reciente, que impedían valorar aspectos diferenciadores de la intensidad, algo que si se agudizó con el desarrollo del pez.

Con el presente estudio, se pone de manifiesto cuales son las condiciones idóneas del sistema V.I.E. en dorada en términos de tipo de color, ubicación, orientación, tasas de retención y mortalidad, crecimiento y coste económico; permitiendo establecerlo como un método de marcaje a investigar desde las tallas más pequeñas de 7 gramos hasta la talla comercial.

## **AGRADECIMIENTOS**

Los autores desean agradecer a Manuel y Ada, del Instituto Canario de Ciencias Marinas, su ayuda en el mantenimiento de los peces. A Mónica Palicio por su asistencia técnica. El trabajo ha sido cofinanciado con los proyectos ACU00-005 del Instituto Nacional de Investigaciones Agrarias y PI2000/063 del gobierno de Canarias.

## REFERENCIAS

- AFONSO, J.M., MONTERO, D., ROBAINA, L., FERNÁNDEZ, H., IZQUIERDO, M., GINÉS, R., 1998. Selection programmes for stress tolerance in fish (Review). Cah. Options Méditerran., 34:235-245.
- BAILEY, R., IRVINE, J., DALZIEL, F. AND NELSON, T. 1998. Evaluations of visible implant fluorescent tags for marking coho salmon smolts. North American Journal of Fisheries Management 18: 191-196.
- BONNEAU J.L., THUROW R.F. Y SCARNECCHIA, D.L. 1995. Capture, marking, and enumeration of juvenile bull trout and cutthroat trout in small, low-conductivity streams. North American Journal of Fisheries Management 15: 563-568.
- DEWEY, M. y ZIGLER, S. 1996. An evaluation of fluorescent elastomer for marking bluegills in experimental studies. The Progressive Fish-Culturist 58:219-220.
- FREDERICK, J.L. 1997. Evaluation of fluorescent elastomer injection as a method for marking small fish. Bull. Mar. Sci. 61: 399-408.
- GINÉS, R. 1997. Posibilidades de manipulación del fotoperíodo durante el engorde intensivo de dorada (*Sparus aurata*). Tesis Doctoral U.L.P.G.C.
- HALE, R.S. y GRAY, J.H. 1998. Retention and detection of coded wire tags and elastomer tags in trout. North American Journal of Fisheries management 18: 197-201.
- HERBINGER, C.M., O'REILLY, P.T., DOYLE, R.W., WRIGHT, J.M., O'FLYNN, F., 1999. Early growth performance of Atlantic salmon full-sib families reared in single family tanks versus in mixed family tanks. Aquaculture 173:105-116.
- HUGHES, T., JOSEPHSON, D., KRUEGER, C. AND SULLIVAN, P. 2000. Comparison of large and small visible implant tags: retention and readability in hatchery brooks trout. North American Journal of Aquaculture 62: 273-278.
- KNIBB, W.R., GORSHKOVA, G., GORSHKOV, S., 1998. Selection and crossbreeding in Mediterranean cultured marine fish (review). Cahiers Optins méditerranéennes, 34: 47-61.
- SPSS (v10.0). SPSS Inc. Headquarters, 233 S. Chicago, Illinois 60606.
- WILLIS, T.J. y BABCOCK, R.C. 1998. Retention and *in situ* detectability of visible implant fluorescent elastomer (VIFE) tags in *Pagrus auratus* (Sparidae). New Zealand journal of Marine Freshwater Research 32: 247-254.