

**FACULTAD DE CIENCIAS**  
**GRADO EN CIENCIAS DEL MAR**  
**TRABAJO FIN DE GRADO**  
**CURSO ACADÉMICO [2014-2018]**

TÍTULO:

**ANÁLISIS MORFOMÉTRICO DE OTOLITOS COMO  
HERRAMIENTA DE TRAZABILIDAD DE DORADAS  
(*Sparus aurata*) ESCAPADAS EN CANARIAS**

AUTOR:

**ADRIÁN VILLAR MONTALT**

## Resumen

Los escapes producidos en jaulas de cultivo flotantes preocupan al sector acuicultor, tanto por las pérdidas económicas generadas como por las posibles interacciones ambientales que pueden producir. En el caso de Canarias, la dorada (*Sparus aurata*) era una especie ausente en las islas centrales que posteriormente introdujo la actividad acuícola en los años 90 y de cuyas poblaciones no existen evidencias de automantenimiento o reproducción en condiciones salvajes. De este modo, la población de dorada presente en el medio salvaje se considera escapada y en proceso de asilvestramiento. Aunque se ha abordado el estudio de estructuras duras (escamas y otolitos) para discriminar entre individuos cultivados y salvajes (Arechavala-López *et al.*, 2012), nada se sabe de la plasticidad morfométrica de estas estructuras una vez el pez se introduce en el medio natural. Con el fin de comprobar las diferencias morfológicas entre otolitos de individuos de cultivo frente a escapados, se capturaron 20 ejemplares de *S. aurata* de jaulas de cultivo y 40 del medio salvaje (de entre 0 - 6 años de vida libre) en Tenerife, Islas Canarias. A las capturas se les extrajo la fracción de mayor tamaño de los otolitos, par de sagittae. El ejemplar izquierdo de cada par fue pesado y se midieron sus descriptores de contorno: área, perímetro, redondez, circularidad, longitud de los ejes mayor y menor e índice de aspecto. Además, se realizó un análisis de Fourier de la imagen de la cara interna del otolito, lo que proporcionó una serie de funciones capaces de describir un patrón de las irregularidades en el contorno del sagittae de la especie. Además, se analizó la morfología del surco acústico (sulcus acusticus) con el fin de evaluar su potencial como región clave para la discriminación morfométrica. Los resultados obtenidos indican que los otolitos de doradas escapadas conservan su apariencia externa tras la fuga durante el periodo de tiempo de vida libre estudiado. Sin embargo, los otolitos provenientes de jaulas distintas poseen perfiles e índices de contorno aparentemente diferentes. Factores como el origen genético y la edad parecen ser los más determinantes respecto a la morfometría externa del sagittae. Por otro lado, el análisis del surco acústico no permitió hallar diferencias entre los escapes y las doradas de cultivo. La solidez y estabilidad de los otolitos, respecto a otros indicadores, apoyan su posible uso como trazador, permitiendo distinguir incluso individuos cultivados en diferentes instalaciones de una misma región geográfica. El análisis de contorno resulta un método de diferenciación poblacional e identificación de origen que podría funcionar a modo de complemento de los sistemas de marcaje modernos como el térmico o químico o bien como procedimiento rápido y de bajo costo.

**Palabras clave:** Acuicultura, escapes, otolito, contorno, Islas Canarias.

## **Abstract**

The escapes produced in floating culture cages worry the aquaculture sector, both for the economic losses generated and for the possible environmental interactions that they can produce. In the case of the Canary Islands, the sea bream (*Sparus aurata*) was not present in the central islands until the aquaculture activities arrived at the 90's. By now, there are not wild autosustaining or reproduction evidences. That means the sea bream that can be found onto wild environment is in a feralitizacion process. Although the study of hard structures, like scales and otoliths, has been done to discriminate between cultivated and wild individuals (Arechavala-López *et al.*, 2012), nothing is known about this structures morphometric plasticity once the fish is introduced onto the natural environment. With the purpose of check the differences between culture fishes and escaped fishes, 20 specimens of *S.aurata* from cages and 40 specimens from wild environment (between 0 and 6 years of wild life) were caught in Tenerife, Canary Islands. Then, the greater fraction from the otolith was extracted, the pair of sagittae. The left from them was weighted and shape descriptors as: area, perimeter, roundness, circularity, axis lenght, and aspect ratio were mesured. In addition, a Fourier analysis from the inner side of the otolith was done, wich provided a serie of functions capable of describing the pattern of irregularities in the shape of sea bream saggitae. Further, the acoustic groove (sulcus acusticus) morphology was analyzed with the purpose of evaluate his potential as a key zone to morphometric discrimination. The results show that sea bream otoliths preserve their external appearance after the escape, at least troughout the studied wild life period. Nevertheless, otoliths from different cages showed shapes and countour ratios apparently different. Factors as genetic origin and age seem to be the most determinants about sagittae external morphometry. On the other hand, the acoustic groove analysis did not allowed to find differences between escaped sea breams and those of culture. The otolith solidity and steadiness, in regard to other biological indicators, support his posible utility as origin tracer, allowing to distinguish even cultured individuals from different aquaculture companies fromthe same geographical region. The shape analysis turns out to be a population distinction and origin identification method that can works as a support for modern mark systems as thermal or checchemical marks or as a quick and low-cost procedure.

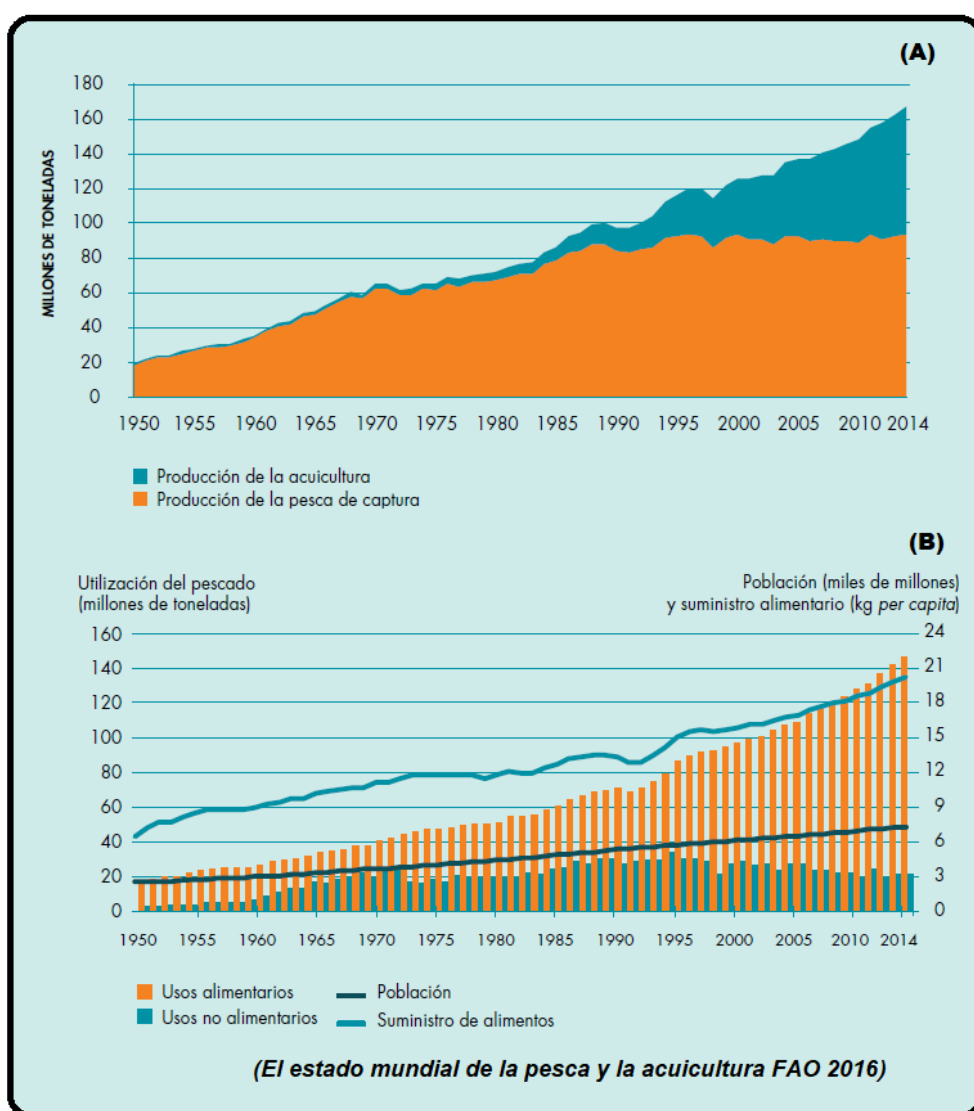
**Keywords:** Aquaculture, escapes, otolith, shape, Canary Islands.

# ÍNDICE

- Introducción.....1
- Antecedentes .....9
- Hipótesis y objetivos.....9
- Material y Métodos.....10
- Plan de trabajo.....14
- Resultados.....15
- Discusión.....23
- Conclusiones.....28
- Bibliografía.....31

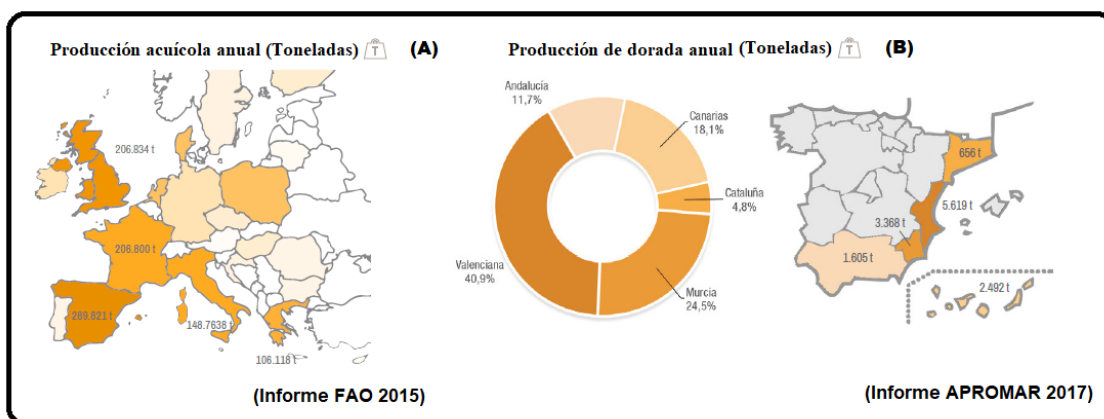
## Introducción

El cultivo de organismos marinos posee una relevancia económica, ambiental y social que no ha cesado de crecer desde los años 50, llegando a obtener una producción mundial en toneladas equiparable a la obtenida por la pesca extractiva en el año 2014 (FAO 2016; Figura1A). Este fenómeno se atribuye a la estabilidad que alcanzaron las pesquerías alrededor de los años 80 debida a la intensa explotación de los stocks (Delgado *et al.*, 2003). El aumento de la población mundial se encuentra ligado necesariamente a un incremento de la demanda de recursos primarios. De este modo, el sector de la acuicultura supone una fuente de alimentos e ingresos de creciente peso en la sociedad actual, llegando a aumentar su producción para consumo humano el doble respecto al crecimiento demográfico (Figura1B).



**Figura1:** (A) Evolución de la producción de pesca de extracción y acuicultura entre 1950 y 2014 en millones de toneladas; (B) Evolución del uso del pescado *per capita* y evolución de la población mundial entre 1950 y 2014.

Dentro del marco europeo, en 2015 España se situó entre los cuatro países punteros en la producción acuícola (FAO 2015; Figura2A) y el tercero respecto a la acuicultura de peces del continente. En el entorno nacional, destaca la producción de peces como la lubina, la dorada o el rodaballo; estando en cabeza comunidades autónomas como: Comunidad Valenciana, Murcia, Galicia, Andalucía e Islas Canarias (APROMAR 2017; Figura2B). Asimismo, el creciente número de concesiones, la evolución en el mercado europeo y el desarrollo de la industria nacional requieren del estudio de aspectos como el rendimiento, la innovación en métodos de cultivo o el impacto ambiental que genera la actividad. Destaca, por el especial interés de la Unión Europea, el objetivo de consolidar una acuicultura de carácter sostenible (Estrategia Europa 2020). Es por ello por lo que en España se aprobó la Estrategia Española de Desarrollo Sostenible (2007) y se apoyan organizaciones como OESA o Fundación biodiversidad y proyectos como MediterraneON o AcuiVerde.

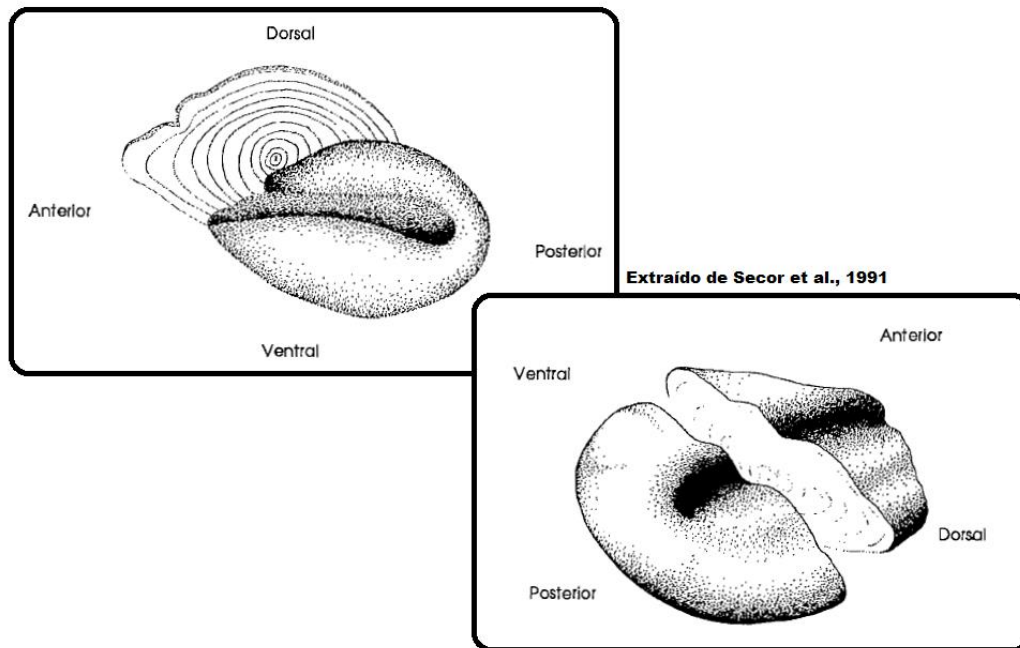


**Figura2:** (A) Producción en toneladas de peces de los principales países productores acuícolas europeos en 2015; (B) Producción de dorada en toneladas de las principales comunidades autónomas productoras de España en 2017.

Entre los principales efectos negativos de la acuicultura sobre el medio marino (Boyd *et al.*, 2005; James, 2009) se incluyen, en orden de importancia: los escapes y su potencial como especies invasoras (Canónico *et al.*, 2005), el efecto de eutrofización de las masas de agua (Beveridge *et al.*, 1997; Goldberg y Naylor, 2005), el impacto sobre ecosistemas sensibles (Boyd y Clay, 1998; Primavera, 2005), la transferencia de parásitos (Krkoek *et al.*, 2006; Brooks y Jones, 2008), la alteración genética de la población natural a causa de la interacción de peces escapados con salvajes (McGinnity *et al.*, 1997; Fleming y Einum, 1997, Glover *et al.*, 2013), la mortalidad de depredadores del medio natural como mamíferos o aves (Price y Nickum, 1995) o la contaminación del agua circundante y

liberación al medio de antibióticos (Lalumera *et al.*, 2004; Soto y Norambuena, 2004; Machias *et al.*, 2004). De ellos, la mayoría se encuentran relacionados con la fuga de individuos capaces, por ejemplo, de desequilibrar cadenas tróficas, desplazar especies locales, generar competencia interespecífica, alterar puntualmente el stock pesquero o propagar patógenos. Por tanto, la identificación de organismos fugados es una herramienta de alta trascendencia a la hora de realizar estudios de impacto tanto a nivel local y focalizado como de extensión y alcance del escape (Hansen y Jacobsen, 2003).

A partir de los años 80, ligado a la expansión de la acuicultura, aumentó el interés por establecer y mejorar criterios que permitiesen diferenciar la población escapada de la natural. Los primeros métodos de identificación se basaban en diferencias morfológicas y morfométricas (Winans, 1985; Shepherd, 1991; Turan, 1999) y las primeras investigaciones tenían como especies objetivo el salmón atlántico (*Salmo salar*) y el salmón del pacífico (*Oncorhynchus kisutch*) (Riddell y Legget, 1981; Winans, 1984; Swaine *et al.*, 1991). Se hacía uso de patrones de crecimiento o de la presencia/ausencia de ciertos caracteres morfológicos como el perfil de las aletas caudal, pectoral y anal, el acortamiento de la cobertura de las agallas, las deformaciones en la mandíbula inferior o el nivel de pigmentación del organismo. Sin embargo, los patrones morfológicos estaban sujetos a cambios ambientales (Clayton, 1981). Por otro lado, desde los años 90 evolucionaron y se innovaron técnicas de morfometría aplicadas a estructuras biológicas duras para determinar la edad de los peces (Erickson, 1983; Wright *et al.*, 1990; Steinmetz y Müller, 1991; Lund y Hansel, 1991; Popper *et al.*, 2005). Dichos procedimientos trataban de establecer el patrón natural de crecimiento de estructuras como escamas u otolitos de una especie en cautividad y encontrar diferencias con la morfología de las extraídas de ejemplares escapados. Tanto escamas como otolitos poseen un modelo de desarrollo radial y discontinuo. Es decir, crecen formando anillos concéntricos a distinta velocidad según las condiciones metabólicas del organismo, influenciadas por las condiciones del medio y su genética principalmente (Geffen, 1983; Geffen, 1992; Morales-Nin, 2000). De este modo, en periodos favorables se distinguen bandas de poca densidad o zonas hialinas (translúcidas), debido al alto depósito de materia orgánica, y en periodos desfavorables se aprecian bandas de alta densidad (zonas opacas) a causa del bajo depósito de materia orgánica (Figura3).



**Figura3:** Cortes transversales de un otolito. Estructura interna en anillos concéntricos y morfología común.

Por otro lado, a partir de la distancia entre las bandas es posible estimar la duración de los periodos favorables y desfavorables en la vida del pez. Haciendo uso de la densidad de las bandas y la distancia entre las mismas, se interpretan, por ejemplo, las transiciones entre agua dulce y agua salada por las que cruza el organismo o los cambios estacionales que sufre (Eckmann y Rey, 1987). Otro parámetro de interés es la propia microquímica del otolito. A partir de ella también es posible estimar transiciones entre medios o estaciones (Avigliano *et al.*, 2017). Por último, también es posible analizar la microestructura de la superficie del otolito, identificando carencias alimenticias o cambios ambientales ligeros (Tanaka *et al.*, 1981).

Actualmente, la industria del sector acuícola hace uso de métodos de marcaje más complejos, tanto en peces de temprana edad (alevines) como en peces de mediana edad o adultos. En hatcheries, o empresas de reproducción y crianza, el proceso consiste en el marcaje térmico del otolito (Hagen *et al.*, 1995; Morita *et al.*, 2013) o bien en el marcaje químico empleando calcina (Negus y Tureson, 2004; Stubbing y Moss, 2007), tetraciclina (Secor *et al.*, 1991; Jones *et al.*, 1999), cloruro de estroncio (Schroder *et al.*, 1995), así como isótopos estables o elementos procedentes de tierras raras (Thorrold *et al.*, 2006; Munro *et al.*, 2008; de Braux *et al.*, 2014). Estos métodos alteran la estructura de crecimiento del otolito, generando bandas concéntricas de una densidad distinta a la natural e identificables mediante la simple observación de este o, en el caso de algunos marcajes químicos, precisando de exposición a luz longitudes de onda específicas. En el



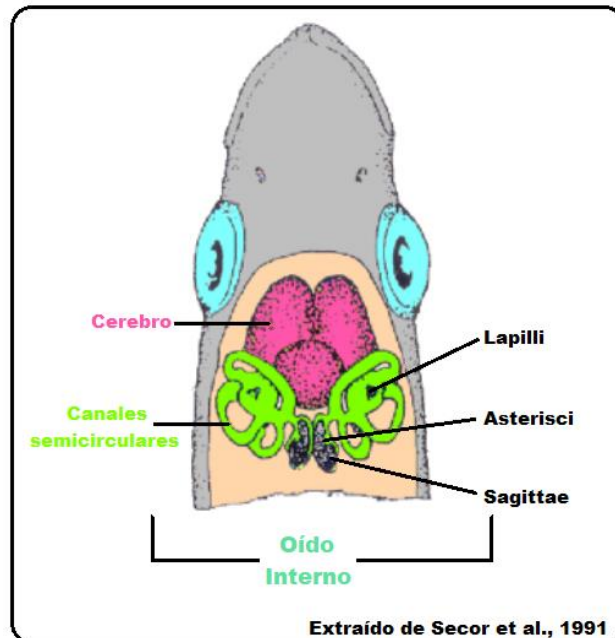
caso de empresas que tratan con peces de edad más avanzada, el marcaje se puede realizar utilizando las mismas técnicas que en hatcheries, aunque habitualmente se opta por alternativas como los cortes en la aleta adiposa o etiquetados con filamentos rígidos combinadas con marcaje térmico o químico del otolito (Hayes y Livingstone 1955; Vander-Haegen *et al.*, 2005). No obstante, las técnicas de marcaje actuales poseen distintos inconvenientes. En ocasiones, el marcaje térmico del otolito presenta problemas para identificar el rastro (Hagen *et al.*, 1995). Las marcas químicas pueden producir problemas de crecimiento o incluso bajas tasas de mortalidad (Gilderhus y Marking, 1987; Mohler, 2003). Además, son dependientes del tiempo de exposición y requieren de un estudio previo para asegurar su eficiencia.

Por último, el marcaje a partir de cortes o etiquetado (marcaje externo) resulta costoso económicamente (Hammer y Blakenship, 2001), puede derivar en un aumento de la mortalidad de la población y, en algunas circunstancias, resulta poco efectivo debido a la regeneración natural del pez, a los desgarres en su piel o al propio fallecimiento.

A causa de las desventajas mencionadas, recientemente se encuentran en estudio nuevos métodos de bajo costo y buena eficiencia. Un ejemplo de tratamiento en desarrollo es el marcaje por inmersión de larvas, o incluso huevos, mediante nuevas disoluciones de isótopos estables (Warren-Myers *et al.*, 2018). Otra metodología de interés es el seguimiento y reconocimiento a partir de análisis genéticos (Estoup *et al.*, 1993; Triantafyllidis, 2007). También se encuentra en avance el estudio de las diferencias morfométricas entre escamas de peces de cultivo frente a salvajes con el fin de establecer patrones de crecimiento y perfiles (Lund y Hansel, 1991), obteniendo resultados precisos.

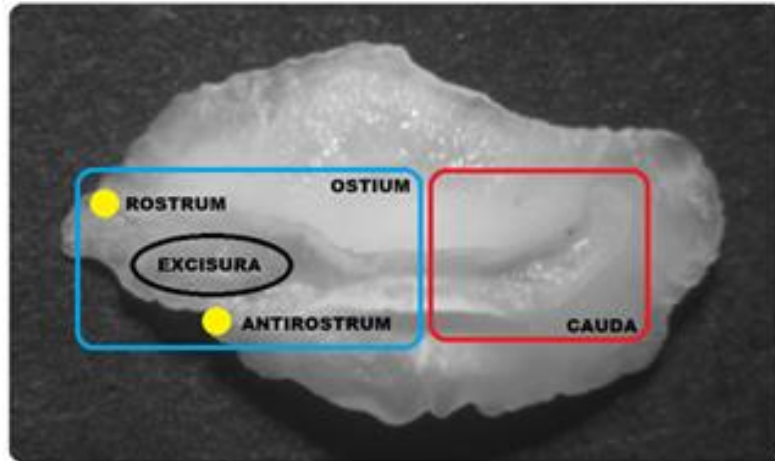
El uso de escamas y otolitos se suele asociar al censo de poblaciones y al establecimiento de curvas talla-edad en función de las relaciones de sus anillos (Taubert *et al.*, 1977; Miller y Storck, 1984; Gauldie y Nelson, 1990). Sin embargo, el otolito supone una estructura biológica interna menos alterable que las escamas, encontrándose protegido del medio dentro de las cavidades cefálicas del pez. Su funcionalidad, composición y morfología han sido descritas ampliamente para distintas especies a lo largo de la historia (Hetch, 1987; Stevenson y Campana, 1992; Campana, 1999; Popper y Lu, 2000). Los otolitos se tratan de un par de componentes minerales que forman parte del oído interno de los peces y que interactúan con el líquido craneoencefálico a través de su canal central o surco (*sulcus acusticus*), desempeñando las funciones de estabilizar al organismo y de captación y amplificación del sonido gracias a su morfología laminar (Tavolga *et al.*, 1981; Popper y Fray, 1997). Se encuentran compuestos casi en su

totalidad por carbonato cálcico (~95%) y se dividen comúnmente en tres fracciones: sagittae, lapilli y asterisci (Figura4).



**Figura4:** Estructuración del oído interno de un osteictio. División del órgano del sonido y posicionamiento de las fracciones del otolito.

La primera de ellas es la más utilizada en estudios de ecología (Hare, 2002; Sponaugle, 2010), paleontología (Nolf, 1995; Elder *et al.*, 1996) e ictiología (Harvey *et al.*, 2000) debido a que posee el mayor tamaño y, por tanto, es la fracción más accesible en la mayoría de las especies (Campana *et al.*, 1993), su microestructura y crecimiento son fácilmente identificables y su desarrollo es susceptible a la variación de parámetros ambientales. Las regiones del sagittae empleadas para la diferenciación de stocks o especies son su contorno y su surco acústico. Respecto al contorno, se estudian principalmente los accidentes en su perfil, lo que define el contorno como anguloso, con muescas, romo, lanceolado... (Tuset *et al.*, 2008); mientras que del surco acústico se caracterizan las regiones “cauda” (región interna y cerrada de la cavidad) y “ostium” (región externa y abierta) (Tuset, 2008; Figura5).



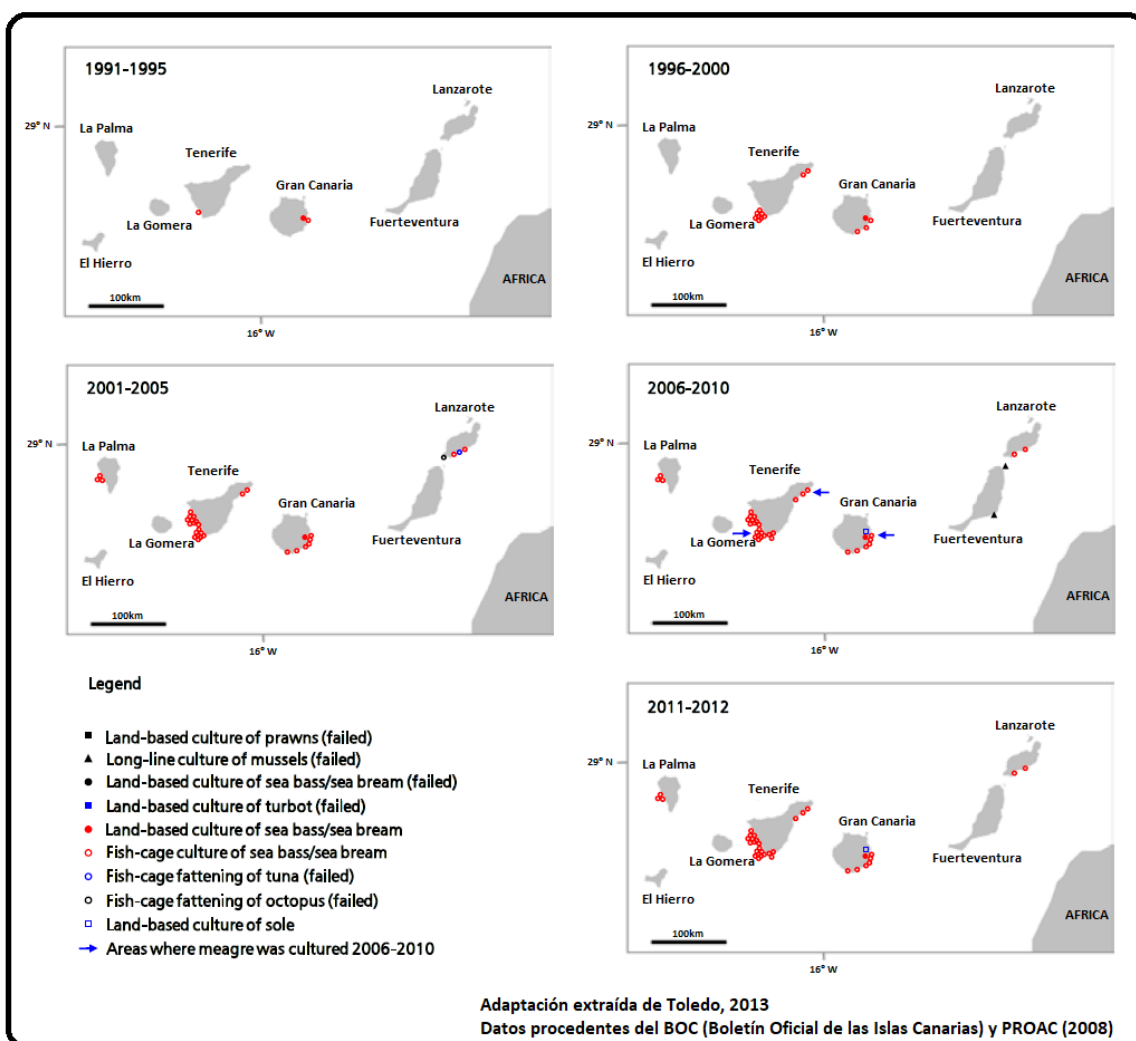
**Figura5:** Plano de la cara interna de un otolito y regiones más significativas del surco acústico (sulcus acusticus).

La estructura morfológica del otolito y crecimiento han sido empleados para diferenciar poblaciones de la misma especie separadas geográficamente (Ramírez *et al.*, 2010) así como para distinguir entre peces de cultivo y peces salvajes (Fernandez-Jover y Sanchez-Jerez, 2014). También se han analizado las diferencias en la forma física y condiciones corporales de peces de cultivo frente a peces salvajes (Fleming *et al.*, 1994). Las escamas y otolitos han sido empleado para discriminar peces salvajes de cultivados (Arechavala-Lopez *et al.*, 2012a). Es bien conocido el potencial de la estructura interna y química de los otolitos para datación y como indicador de cambios ambientales (Campana, 1984; Elsdon y Gillanders, 2004; Sturrock *et al.*, 2012). No obstante, existe un vacío en cuanto a cómo la estructura externa de los otolitos puede reflejar la adaptación de un organismo escapado, cómo refleja su asilvestramiento. En el proceso de asilvestramiento de un individuo fugado confluyen la plasticidad fenotípica (Meyer, 1987) y la selección natural. Dicho de otra manera, el abanico de adaptaciones metabólicas que es capaz de realizar el individuo frente a nuevas condiciones físicas, químicas y biológicas (reflejadas en la transformación de sus rasgos fenotípicos) (Wainright, 1996; DeWitt *et al.*, 1998) y el propio umbral que supone el medio (alimentación, competencia interespecífica, factores climáticos...).

En las Islas Canarias se da una situación peculiar referente a las poblaciones de dorada (*Sparus aurata*), ya que no existen evidencias de su presencia en las islas centrales ni orientales hasta el desarrollo de la acuicultura en los años 90 (Brito *et al.*, 2002), la cual fue más acentuada en las islas de Tenerife, Gran Canaria y La Palma (Figura6).

Por tanto, el mantenimiento de las poblaciones de doradas en las islas centrales de Canarias se atribuye a los escapes de jaulas de acuicultura y asilvestramiento posterior.

La dorada se trata de una especie de espárido subtropical cuya distribución se comprende en el Mediterráneo y en el Atlántico Este, raramente en el Mar Negro (L. Sola *et al.*, 2006). En Canarias tan sólo aparecen esporádicamente en las islas más orientales, posiblemente debido al aporte de juveniles desde la costa sahariana donde la especie es común (Falcón *et al.*, 2002). Se trata de un pez ligado a la zona de surf y a las praderas de fanerógamas marinas que habita entre los 30 y los 150 metros de profundidad (L. Sola *et al.*, 2014). Aunque es principalmente carnívora, es capaz de explotar recursos tróficos primarios, prueba de ello es la adaptación que ha realizado el sector acuícola en su dieta, basándola en pienso de alto contenido vegetal (Izquierdo *et al.*, 2005).



**Figura6:** Evolución temporal y localización de las diferentes actividades acuícolas llevadas a cabo en las Islas Canarias a lo largo de los años 90 y en los primeros años del siglo XXI.

## **Antecedentes**

Los escapes de dorada en Canarias derivan en la introducción de una especie localmente ausente en Gran Canaria, Tenerife y La Palma potencialmente dañina para el medio (Brito *et al.*, 2002). Debido a la preocupación que supone el fenómeno de los escapes en acuicultura a nivel local, se han realizado estudios acerca de la adaptación y hábitos alimenticios de la dorada (Lorenzo *et al.*, 2005); dispersión geográfica (Arechavala-López *et al.*, 2012b); discriminación morfológica entre doradas salvajes y cultivadas (Arechavala-López *et al.*, 2012b); proceso de asilvestramiento y convergencia fenotípica en otros peces de cultivo como la lubina (*Dicentrarchus labrax*) (Toledo, 2013). También se ha hecho uso de escamas (Arechavala-López *et al.*, 2012a; Izquierdo-Gómez *et al.*, 2017) y de la composición química del otolito (Arechavala-Lopez *et al.*, 2016) para diferenciar lubinas y doradas de cultivo de salvajes. Sin embargo, existe una carencia de estudios referentes a cómo se refleja en la morfología del otolito el proceso de asilvestramiento que sufren las doradas escapadas. No obstante, existen bases sólidas sobre cómo tratar la morfometría del otolito (Bird *et al.*, 1986; Stevenson y Campana, 1992; Begg *et al.*, 2001; Pothin *et al.*, 2006; Tracey *et al.*, 2006; Arechavala-López *et al.*, 2012a) y diferenciar poblaciones (Ramírez *et al.*, 2010).

## **Hipótesis y objetivos**

En base a los argumentos aportados anteriormente, el patrón de perfiles de los otolitos y la morfología de su surco podrían ser empleados como indicadores de origen de los organismos. El presente estudio tiene como objetivos (1) analizar la capacidad del otolito como trazador biológico a partir de sus descriptores morfológicos y su morfometría, (2) evaluar la utilidad de dichos parámetros como diferenciadores de poblaciones únicos o complementarios al marcaje, (3) comprobar el grado de plasticidad fenotípica de las doradas de cultivo ligada al otolito y (4) indagar en las posibles disimilitudes en el surco acústico de ejemplares de cultivo frente a asilvestrados.

## Material y Métodos

### Zona de estudio y muestreo

Un total de 60 especímenes de dorada (*Sparus aurata*) fueron recolectados en la costa de la isla de Tenerife (Canarias) en los meses de agosto y septiembre de los años 2008 y 2009. De ellos, 40 fueron capturados con fusil de forma aleatoria en diferentes zonas someras mientras que los otros 20 se adquirieron de granjas de cultivo situadas al este y al oeste de la isla (Figura7). Se tomaron medidas de la longitud estándar ( $L_s$ ) y el peso de los ejemplares y se fotografiaron. Posteriormente se le extrajo la fracción más grande de los otolitos, el par de sagittae, a cada individuo y se almacenó.

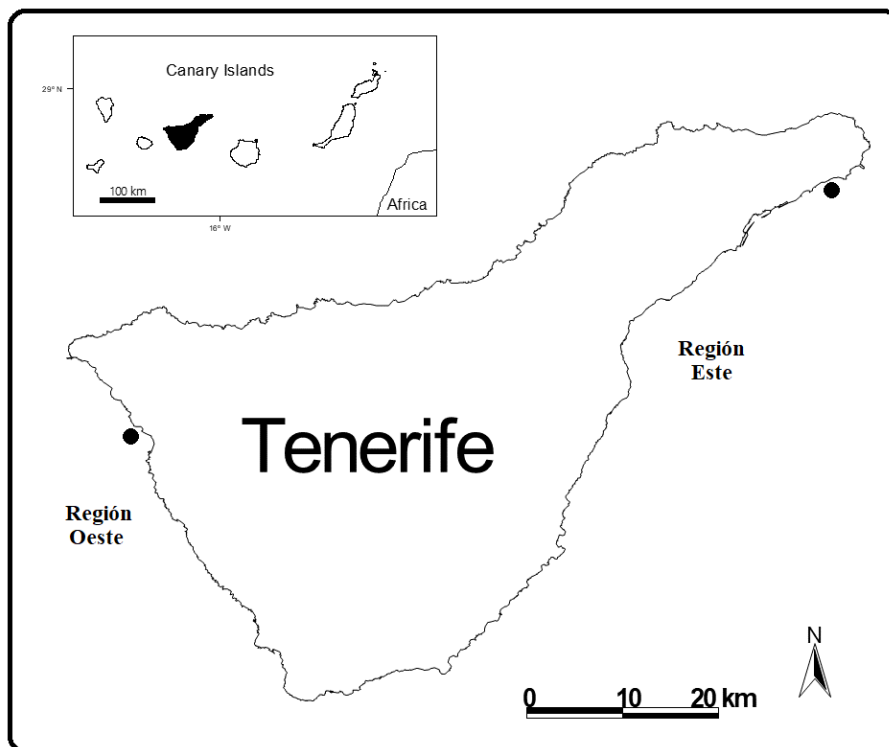


Figura7: Situación geográfica de las zonas de muestreo en Tenerife (Islas Canarias).

### Tratamiento de otolitos

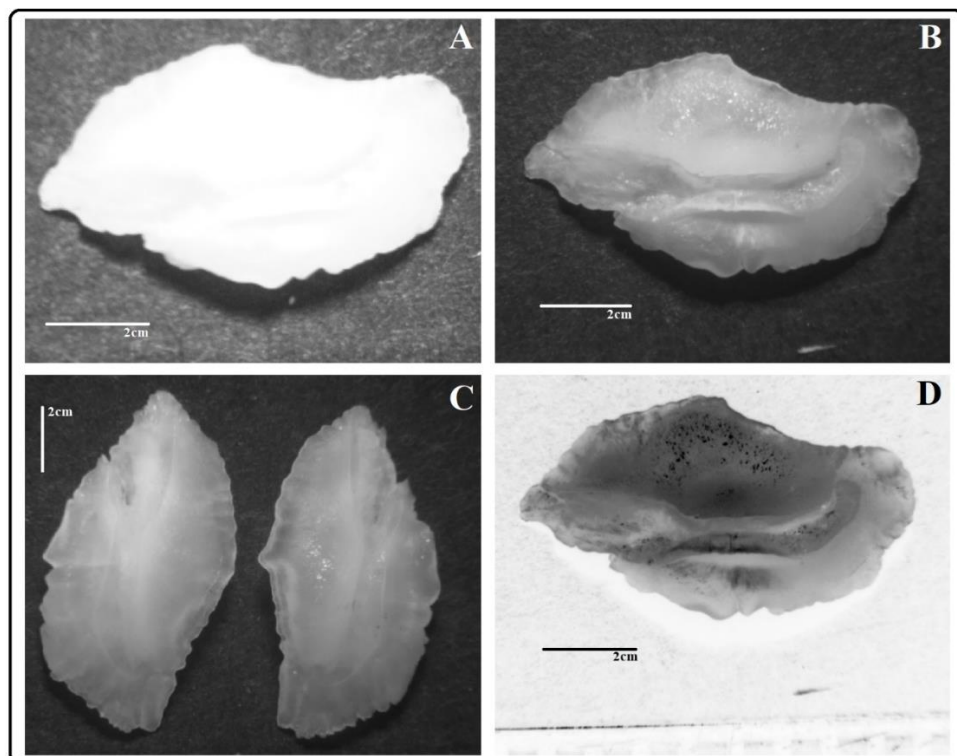
En los laboratorios de la Universidad de Alicante, se revisaron las posibles mellas o fracturas de los otolitos y fueron inventariados. 7 de los pares de sagittae de individuos tuvieron que ser descartados debido a la ausencia de un ejemplar del par, a la falta de datos o al mal estado de conservación. Los otolitos restantes fueron pesados y fotografiados exponiendo el sulcus acusticus (cara interna) y con el rostrum hacia abajo (Figura9b). Para ello se empleó una lupa (Optech LFZtrioocular) de luz reflejada y un

fondo oscuro acompañado de una escala milimétrica (Figura8derecha). Las fotografías fueron tomadas utilizando una cámara digital (uEye UI-1460SE-C-HQ) acoplada a la lupa y el programa asociado uEye Cockpit (Figura8izquierda).



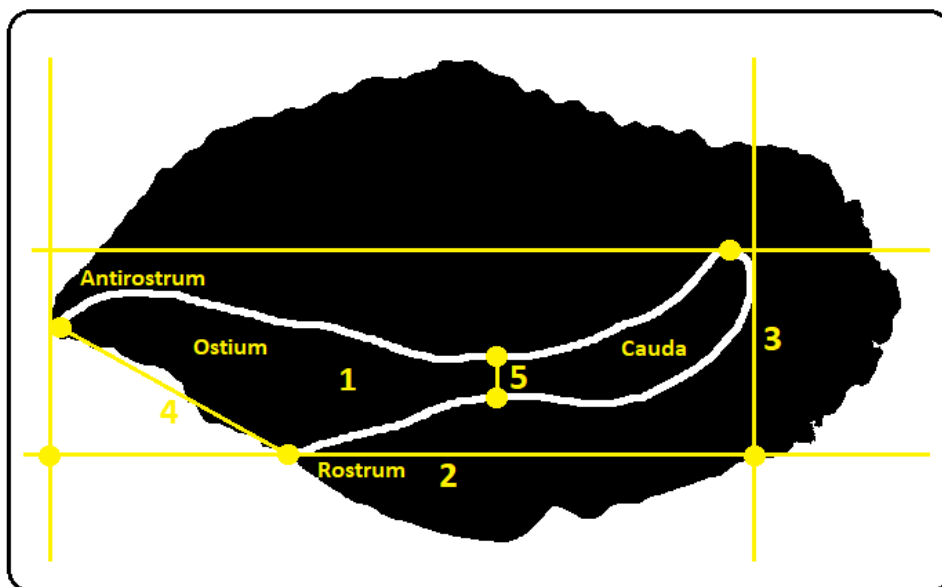
**Figura8:** Entorno de trabajo. A la derecha, selección y posicionamiento del otolito en la lupa. A la izquierda, control del perfil y software de imagen UEyeCockpit.

Se realizaron dos secuencias de imágenes; para la primera se empleó un perfil que resaltaba el contorno del otolito (Figura9a) y en la segunda se destacó la región del surco acústico (Figura9b+d).



**Figura9:** Perfiles de imagen empleados para fotografiar la cara interna del sagittae. A: resalte del contorno; B: resalte del surco acústico; C: ejemplo de par de otolitos estándar; D: resalte de surco en negativo. \*Marca de escala: 2cm

Posteriormente, las imágenes fueron procesadas con ImageJ para medir los descriptores de contorno del ejemplar izquierdo de cada par de sagittae. Se seleccionó el ejemplar izquierdo (Figura9c) porque, generalmente, posee un tamaño superior al del derecho (Neilson y Geen, 1982), aspecto que facilita el tratamiento posterior. Para las imágenes de contorno se tomaron medidas de: área, perímetro, redondez, circularidad, longitud de los ejes mayor y menor y ratio de aspecto. Para las imágenes del surco se midieron: área, longitud máxima (cauda-ostium), anchura máxima, apertura (rostrum-antirostrum), estrechamiento entre cauda y ostium y ratio de aspecto (Figura10).



**Figura10:** Medidas tomadas a partir del contorno del surco acústico. 1: Área; 2: Longitud máxima; 3: Anchura máxima; 4: Apertura rostrum-antirostrum; 5: Estrechamiento.

### Análisis de datos

Primeramente, se establecieron curvas de crecimiento teniendo en cuenta la talla ( $L_t$ ) y peso de las doradas y el peso de sus otolitos con el fin de poseer rectas de calibrado de referencia y analizar el comportamiento de dichas variables base.

Previo al análisis estadístico se realizó una normalización a los datos de perfil y de surco del otolito con Past teniendo en cuenta la relación de la longitud del individuo con los distintos descriptores de contorno y con el peso para eliminar el efecto de la alometría (Gould, 1966; Leonart, 2000) sobre los mismos. Para contrastar las posibles diferencias morfológicas entre los otolitos de doradas debidas a su naturaleza (escapadas o cultivadas), se realizó un test estadístico ANOVA para un modelo lineal univariante (alfa = 0.05) empleando cada uno de los descriptores de contorno como variables y el origen

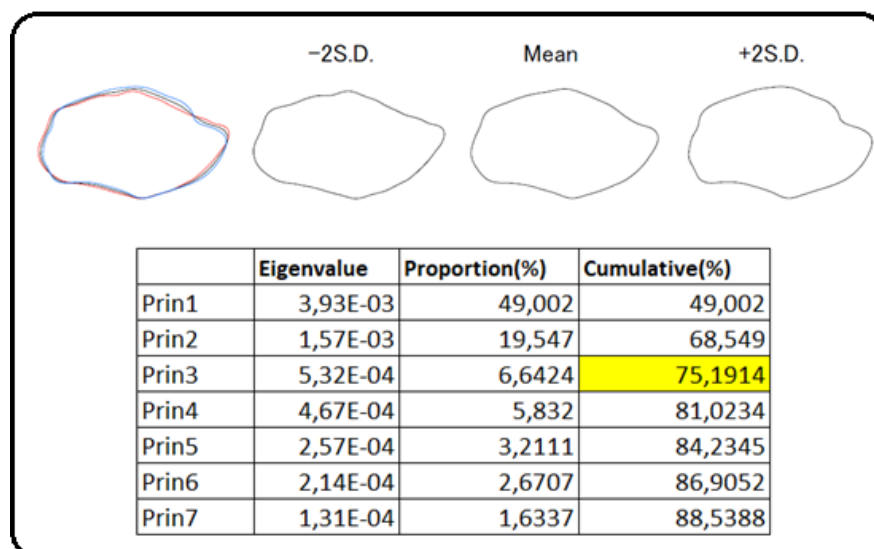


de los individuos (Escapados o Cultivados) como factor. Dicho tratamiento se empleó tanto con los datos referentes al contorno como con los datos del surco acústico.

Además, se realizó un análisis de función discriminante (DFA) con el fin de obtener una función capaz de clasificar los otolitos como provenientes de escape o cultivo empleando sus descriptores de contorno y peso como variables.

Por otro lado, se realizaron análisis de Fourier de la cara interna del otolito izquierdo y del contorno de su surco acústico empleando el software SHAPE de Iwata y Ukai (2002) en base a estudios previos (Bird *et al.*, 1986). Dicho análisis transforma los accidentes del contorno de los sagittae en armónicos o Descriptores Elípticos de Fourier (EFDs). A partir de los armónicos, el software identifica cuales son los perfiles más comunes entre el conjunto de otolitos, discriminando los principales. Además, considera la silueta de cada otolito como una suma de contornos o perfiles principales (Figura11).

Cada uno de estos perfiles posee un peso distinto sobre el perfil medio de todos los otolitos que se puede identificar según su autovalor. Los perfiles considerados como principales en este estudio fueron aquellos cuya suma de aporte relativo de sus autovalores alcanzó el 70% de variabilidad explicada, comenzando a sumar desde el contorno con autovalor de mayor importancia, continuando con el segundo de mayor valor, etc. (Figura11). Asimismo, cada silueta de otolito se traduce en una serie de valores descritos por los EFDs. Dichos valores fueron empleados para generar un gráfico PCA a modo de representación visual de las diferencias asociadas al contorno entre los otolitos.



**Figura11:** Ejemplo de suma de perfiles promedio en Shape. Tabla de autovalores y criterio de selección de los componentes principales.

### Plan de trabajo

El estudio realizado sucedió entre los meses de febrero y abril de 2018 y fue organizado en fases que asegurasen el correcto avance de este. Las diferentes fases fueron: Aprendizaje, Estudio Piloto, Obtención y Tratamiento de información, Análisis de datos y Redacción del estudio. Por otro lado, cada fase se desglosa en distintas actividades o subobjetivos. El aprendizaje comprende la búsqueda preliminar de referencias y antecedentes, la consulta de conceptos básicos, la revisión de manuales de software específico y la comparativa de resultados. La fase de estudio piloto trata de la preparación del material, el inventariado, el pesado de otolitos, la realización de pruebas de software, y la preparación de perfiles óptimos de los softwares de imagen. La obtención y el tratamiento de información consta de la primera toma de imágenes, el tratamiento con ImageJ, la medición de descriptores de contorno, la obtención de EFDs con SHAPE, la limpieza/criba de datos y nuevas pruebas, la segunda toma de imágenes (surco en detalle) y el tratamiento de las nuevas imágenes. La fase de análisis comprende la realización de los test estadísticos ANOVA, DFA y PCA así como del graficado de los resultados. La última fase trata de la redacción de los apartados del estudio, de la estructuración y seguimiento del hilo argumental, del ajuste al formato a los criterios requeridos, de la revisión del tutor y de la modificación previa a la entrega formal del escrito.

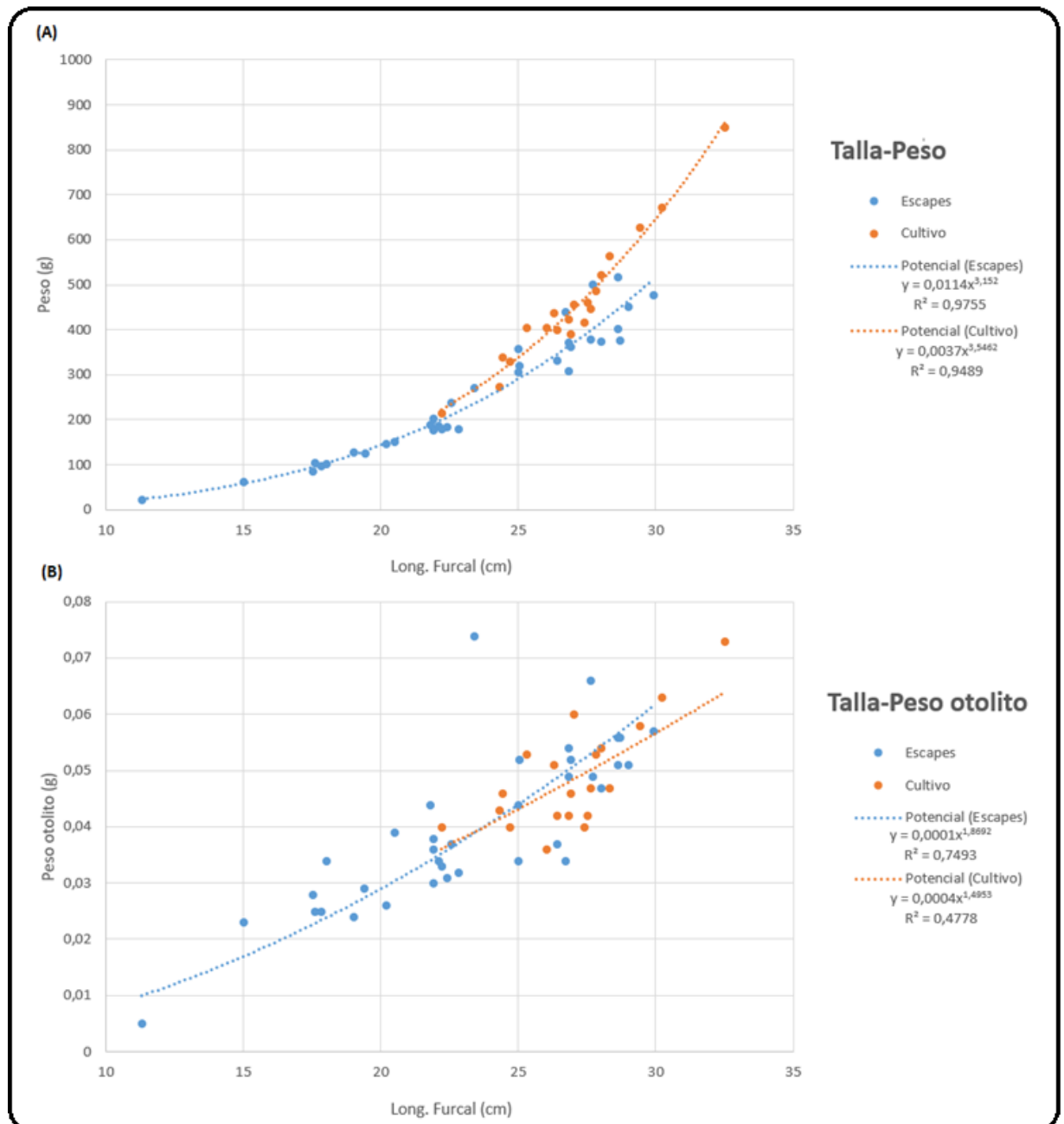
Semana / Fase	Aprendizaje	Estudio piloto	Tratamiento	Análisis	Redacción	Entrega
26/02 - 4/03						
5/03 - 11/03						
12/03 - 18/03						
19/03 - 25/03						
26/03 - 1/04						
2/04 - 8/04						
9/04 - 15/04						
16/04 - 22/04						
23/04 - 29/04						
30/04 - 6/05						
7/05 - 13/05						
14/05 - 20/05						
21/05 - 27/05						
28/05 - 3/06						

**Figura12:** Cronograma. Distribución del trabajo realizado por fases de avance durante el periodo Feb-Jun de 2018.

## Resultados

### Estructura talla peso

La curva de crecimiento talla-peso, mostró un comportamiento positivo (Figura13A). El peso de los individuos posee una relación directamente proporcional con su talla, creciendo de forma regular hasta los 23cm de longitud furcal aproximadamente, donde el peso crece de forma más acentuada.

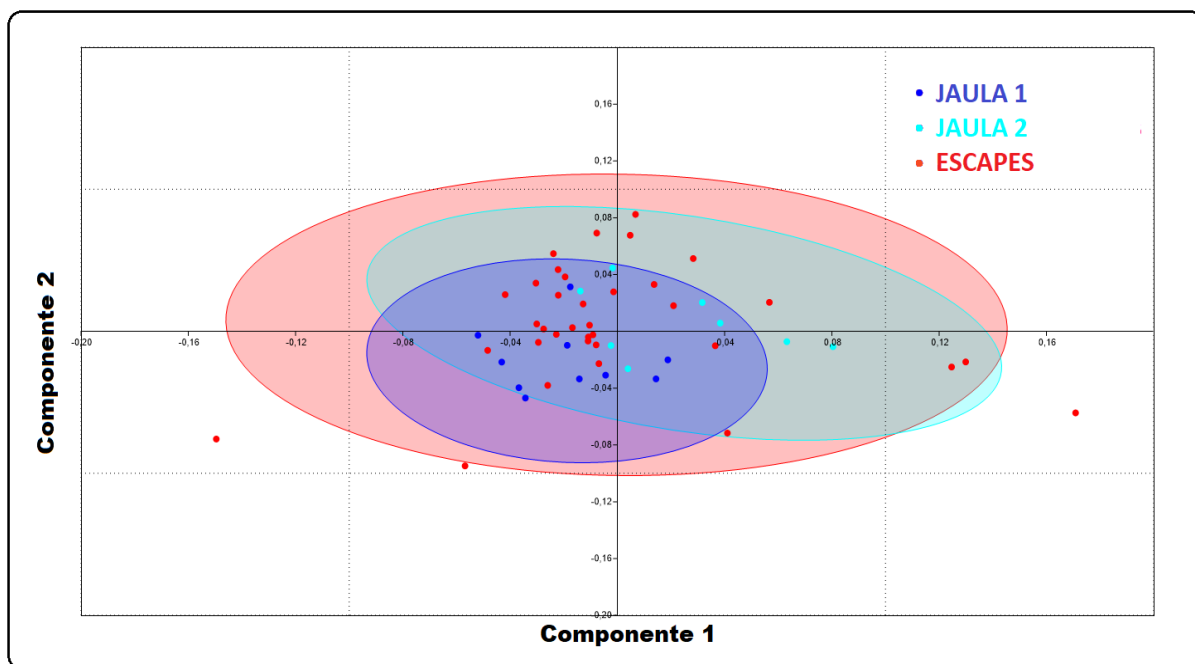


**Figura13:** A: Recta de crecimiento talla-peso para los conjuntos de peces Escapados y Cultivados y líneas de tendencia potenciales; B: Relación talla del individuo-peso de su otolito para los conjuntos de peces Escapados y Cultivados y líneas de tendencia potenciales.

En cuanto a la relación talla del individuo-peso del otolito, su comportamiento también resulta positivo (Figura13B). Aparentemente y de manera general, los individuos de cultivo poseen otolitos de mayor peso que los escapados, aunque se diferencian outliers de ambos grupos. La dispersión de los datos es elevada y el valor de  $R^2$  es bajo.

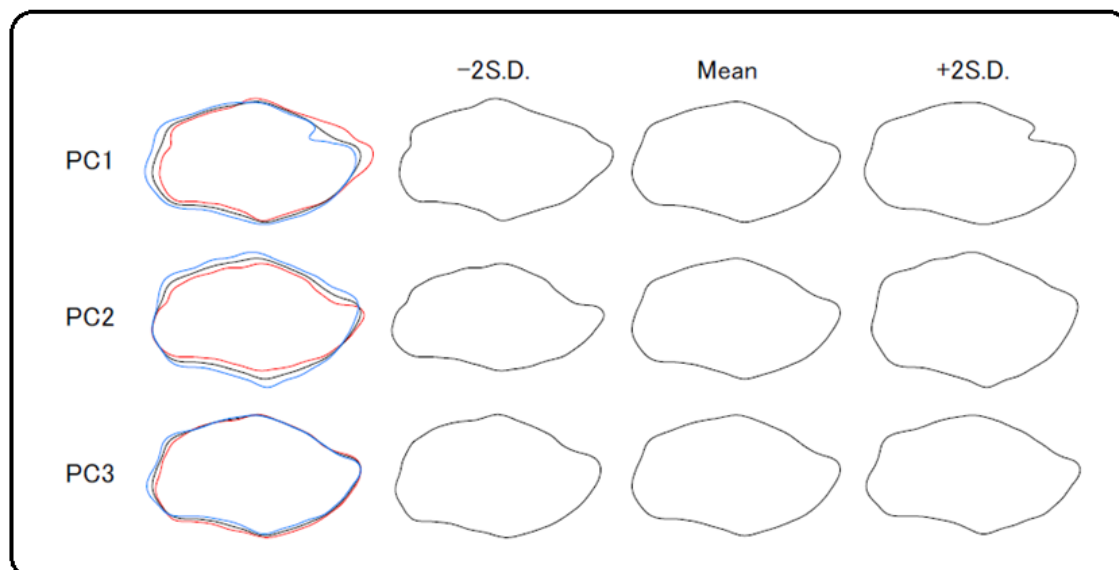
### Análisis del contorno

Los principales descriptores del contorno de los grupos de cultivo y escapados revelan que los individuos salvajes presentan mayor diversidad de siluetas y perfiles más acusados que los individuos de jaula. Además, no hay diferencias significativas entre los perfiles de peces pertenecientes a jaulas distintas. Estos resultados se exponen empleando un análisis de componentes principales (PCA) (Figura14). Es posible discriminar los conjuntos de datos de contorno en tres elipses, donde la elipse de individuos asilvestrados engloba las de individuos de jaulas.



**Figura14:** PCA. Representación de los datos de contorno según el peso de sus componentes principales. Diferenciación en subconjuntos de cultivo (jaula1 y jaula2) y escapes.

Por otra parte, el contorno medio definido por los componentes principales de perfil posee una forma entre pentagonal y elíptica según los conceptos de Tuset *et al.* (2008), con dos regiones de mayor estrechamiento del perfil en la zona superior derecha (post cauda) y en la zona inferior izquierda (apertura del ostium) (Figura15).



**Figura15:** Principales componentes del contorno identificados (suma acumulada de 75% sobre el peso total de los autovalores).

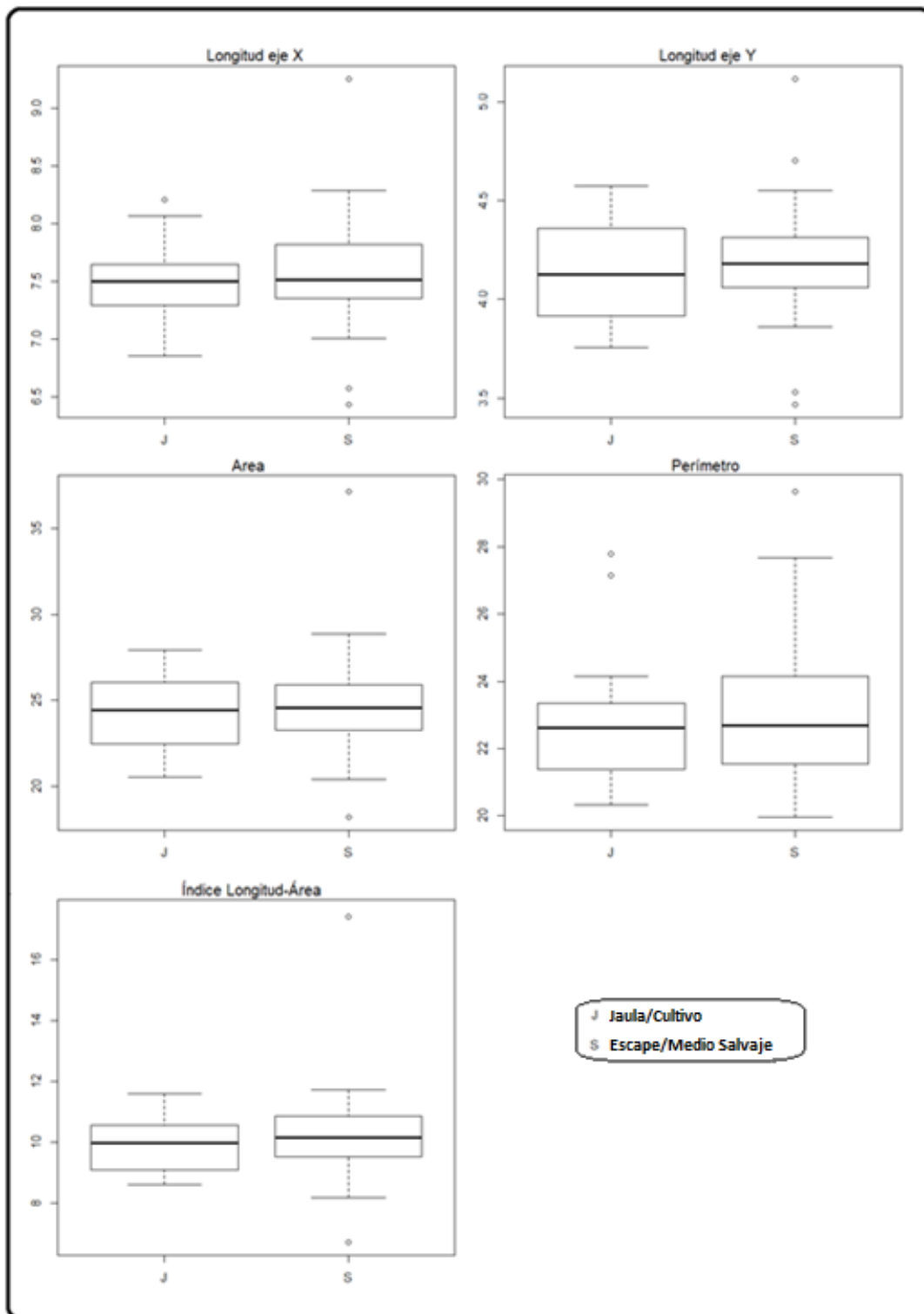
#### Descriptores de contorno, índices y peso

Los resultados del análisis estadístico ANOVA mostraron que no existen diferencias significativas entre los subconjuntos correspondientes al origen para ninguna de las variables (Tabla1).

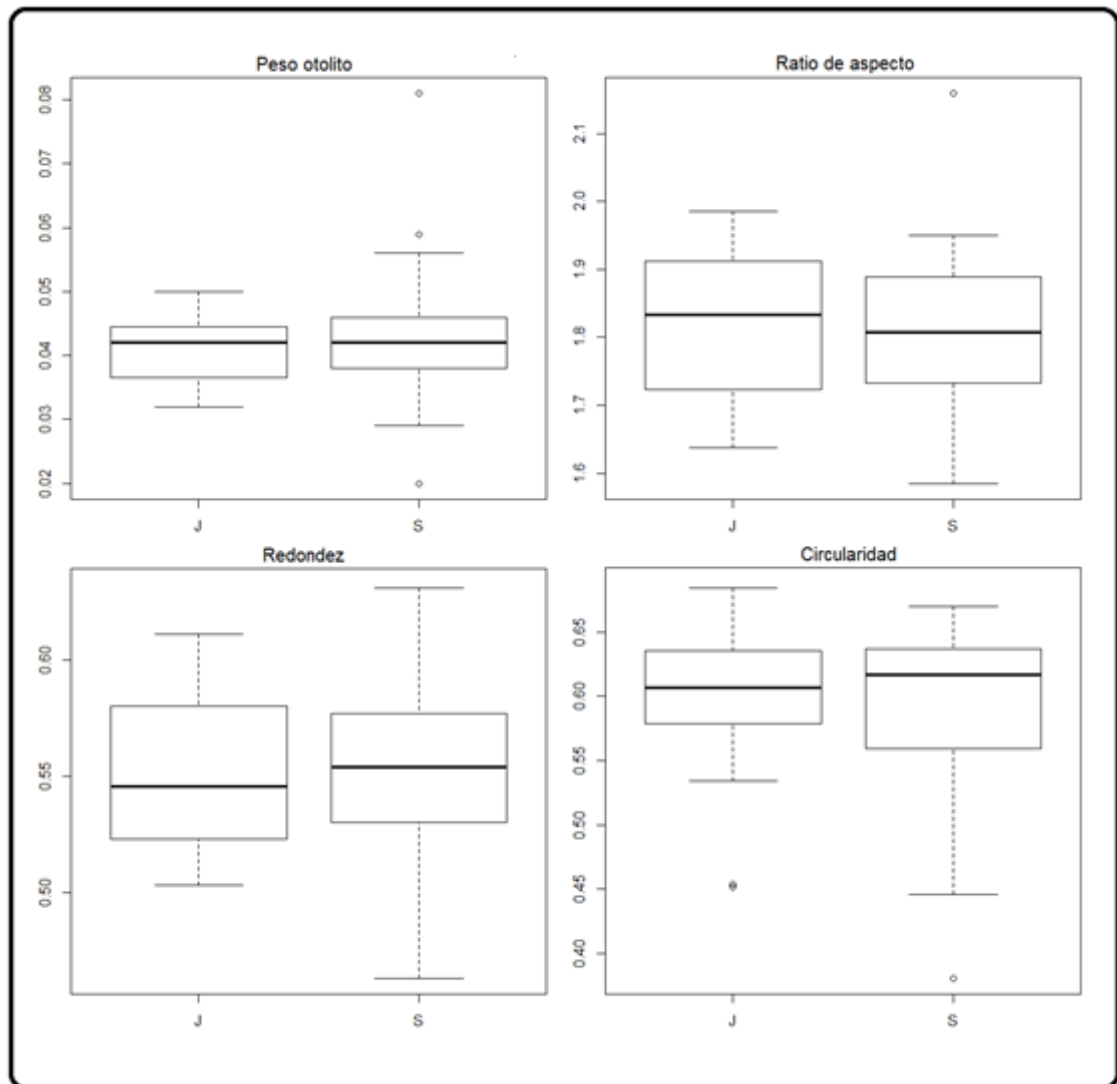
Variables	F value	Pr (>F)
Peso Otolito	0.777	0.382
Eje horizontal	0.255	0.616
Eje vertical	0.425	0.518
Área	0.483	0.49
Perímetro	0.186	0.668
Circularidad	0	0.993
Redondez	0.083	0.774
Ratio Aspecto	0.08	0.779
Índice Contorno	1.264	0.266

**Tabla1:** ANOVA. F y P-valor resultado de ANOVA univariante de cada variable (descriptor de contorno) para los niveles factor origen (escape o cultivo).

Además, el graficado en cajas de los datos permitió evaluar las tendencias existentes. Se encontró que el conjunto de datos relativos a los individuos asilvestrados (S) presentaba una desviación estándar mayor que el conjunto de datos relativos a cultivo (J) en la mayoría de las variables. Sin embargo, el valor de la media fue muy similar en todos los casos (Figura16).

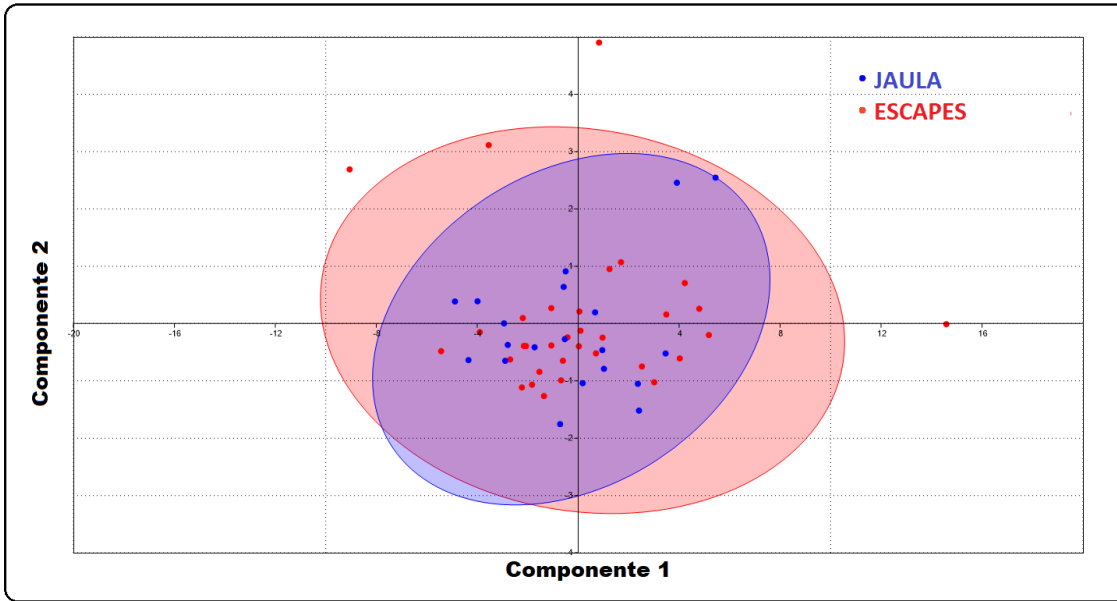


**Figura16.1:** Gráficos de cajas (media —, percentiles  $\top$  y outliers  $\circ$ ) de los distintos descriptores de contorno (Longitud máxima de eje X, Longitud máxima de eje Y, Área, Perímetro e Índice Longitud/Área) para los subconjuntos de “cultivo” (J) y “escape” (S).

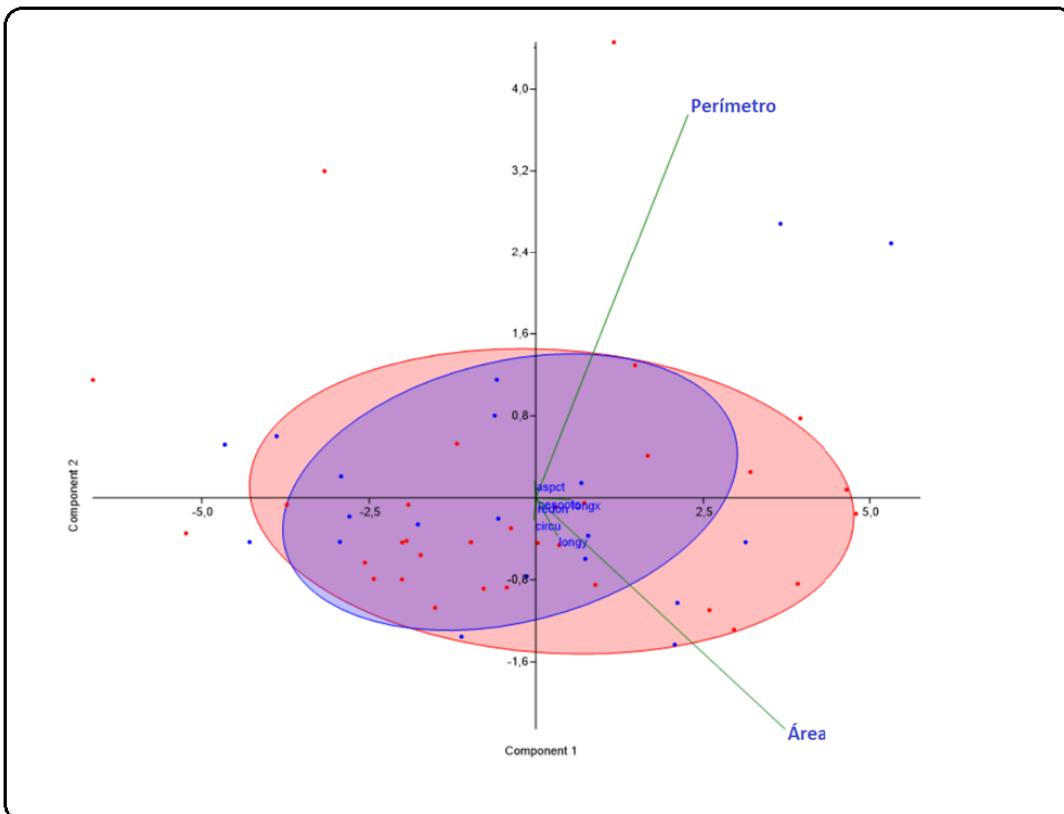


**Figura16.2:** Gráficos de cajas (media  $\rightarrow$ , percentiles  $\sqcap$  y outliers  $\circ$ ) de los distintos descriptores de contorno (Peso del otolito, Ratio de aspecto, Circularidad y Redondez) para los subconjuntos de “cultivo” (J) y “escape” (S).

El gráfico PCA realizado posteriormente proporcionó una perspectiva en conjunto de los resultados de ANOVA, mostrando dos elipses que representaban los subconjuntos de datos y que solapaban en gran medida. Además, exceptuando algunos outliers del subconjunto “escapes”, la dispersión de los datos es similar (Figura17.1). Por otro lado, el perímetro y el área son las variables de mayor influencia sobre el conjunto de datos.



**Figura17.1:** PCA. Representación de los datos de descriptores según el peso de sus componentes principales (variables, descriptores de contorno). Diferenciación en subconjuntos de “cultivo/jaula” y “escapes”.



**Figura17.2:** PCA. Peso de las variables más influyentes sobre la morfometría del contorno y dirección.

Por último, el análisis discriminante (DFA) diferenció correctamente a partir de los descriptores de contorno al 70% de los otolitos pertenecientes a peces de cultivo y al 60.6% de los otolitos provenientes de peces escapados.



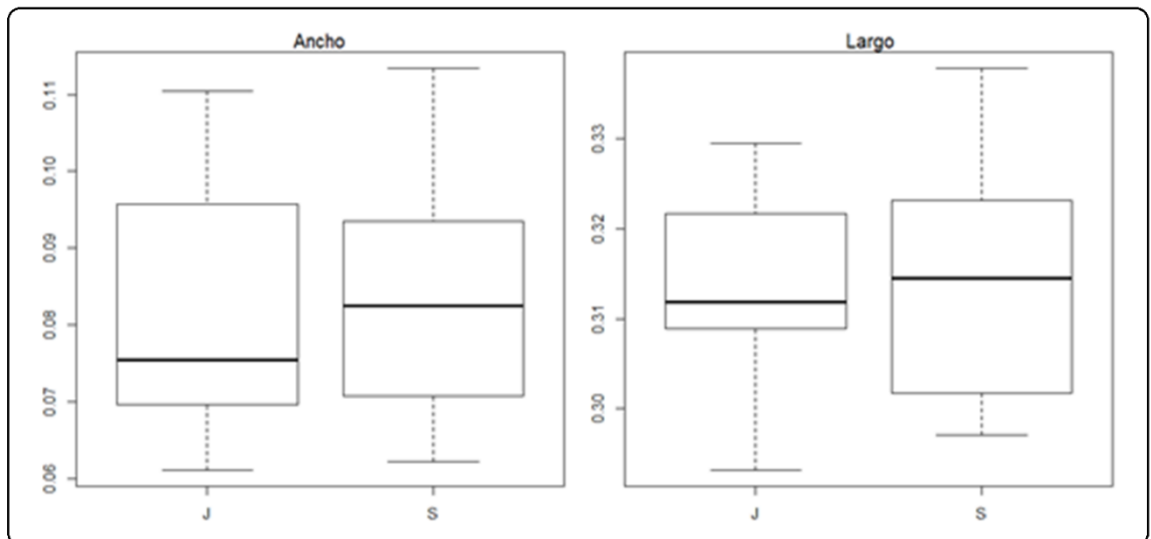
### Análisis del surco acústico

De nuevo, los resultados del test estadístico ANOVA señalaron que no existían diferencias significativas entre los niveles del factor origen para ninguna de las variables estudiadas, con valores de Pr relativamente altos (Tabla2).

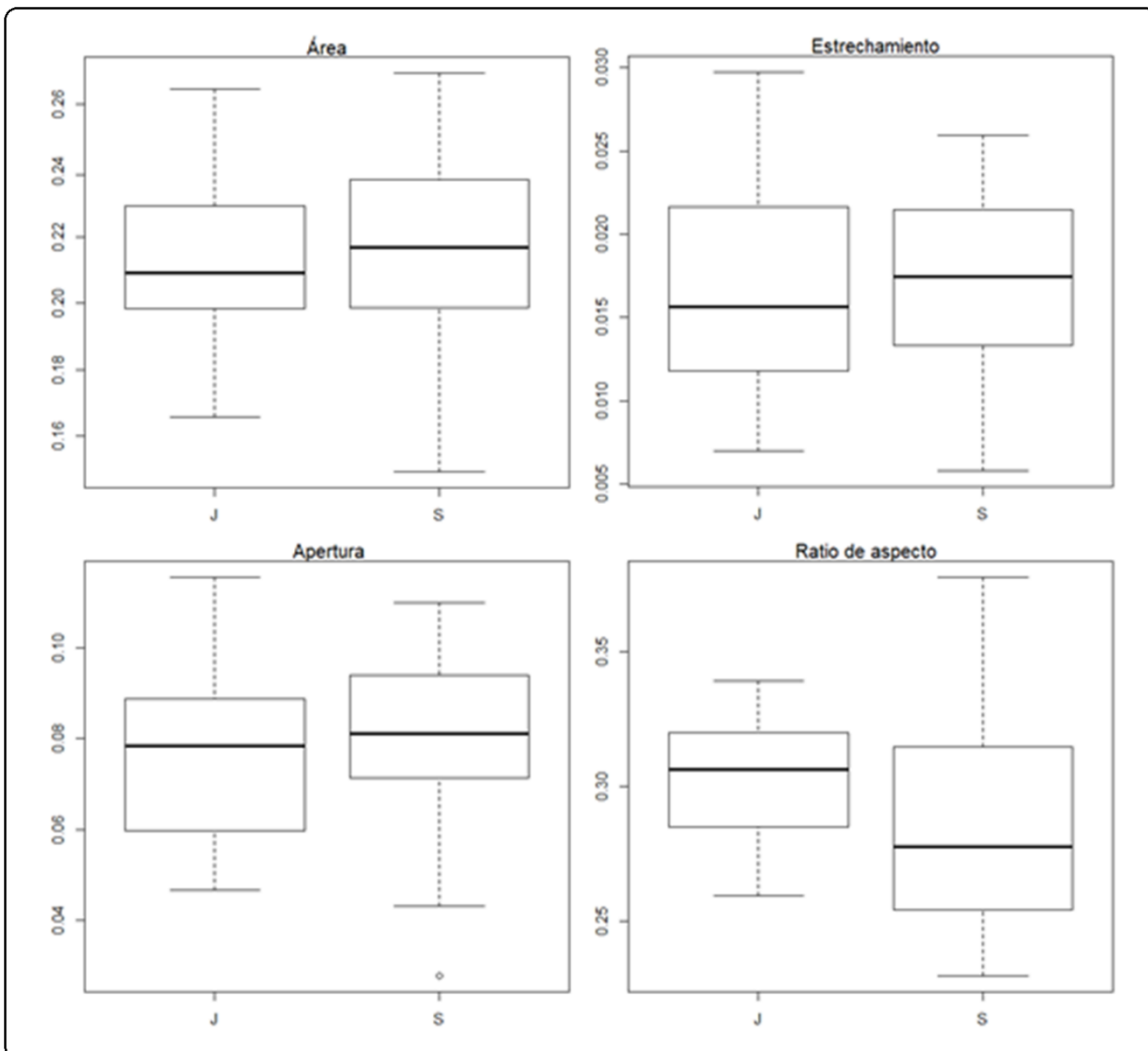
Variables	F value	Pr (>F)
Área	0.87	0.355
Largo	0.175	0.678
Ancho	0.295	0.589
Estrechamiento	0.004	0.949
Apertura Rostrum	0.68	0.413
Ratio Aspecto	2.756	0.103

**Tabla2:** ANOVA. F y P-valor resultado de ANOVA univariante de cada variable del surco para los niveles factor origen (escape o cultivo).

En relación con los gráficos de cajas, se observó que las medias de las variables: ancho, largo, área, estrechamiento y apertura del surco parecían levemente mayores en el subconjunto escapado (S); mientras que la ratio de aspecto asemejaba ser superior en el subconjunto de cultivo (J). La desviación típica fue generalmente similar en ambos grupos (Figura18).

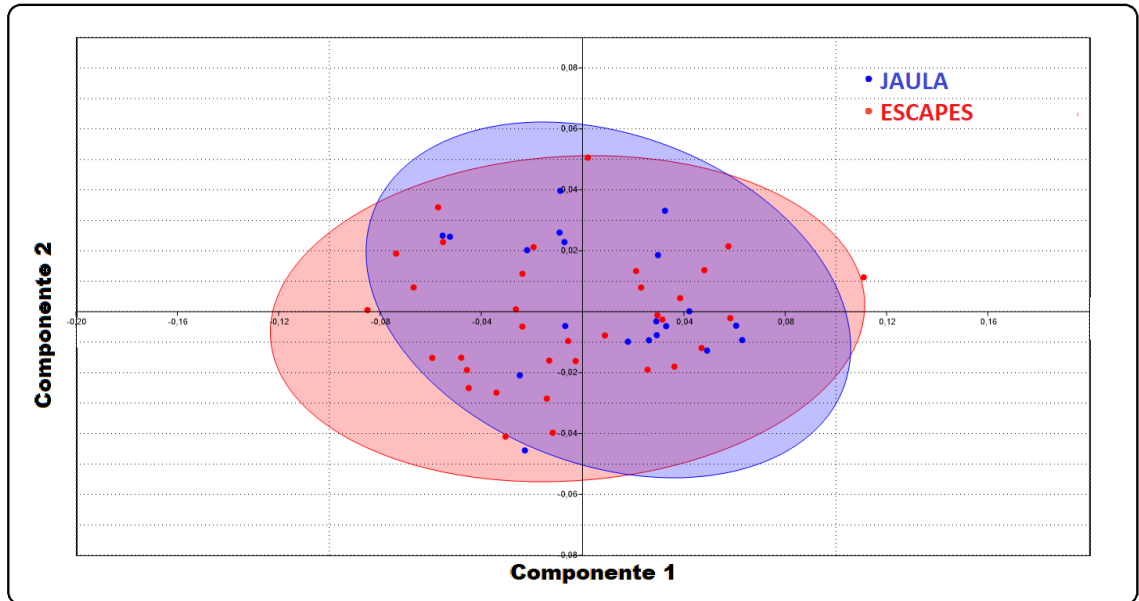


**Figura18.1:** Gráficos de cajas (media —, percentiles  $\square$  y outliers  $\circ$ ) de las distintas variables del surco (Ancho, Largo, Área, Estrechamiento, Apertura y Ratio de aspecto) para los subconjuntos de “cultivo” (J) y “escape” (S).

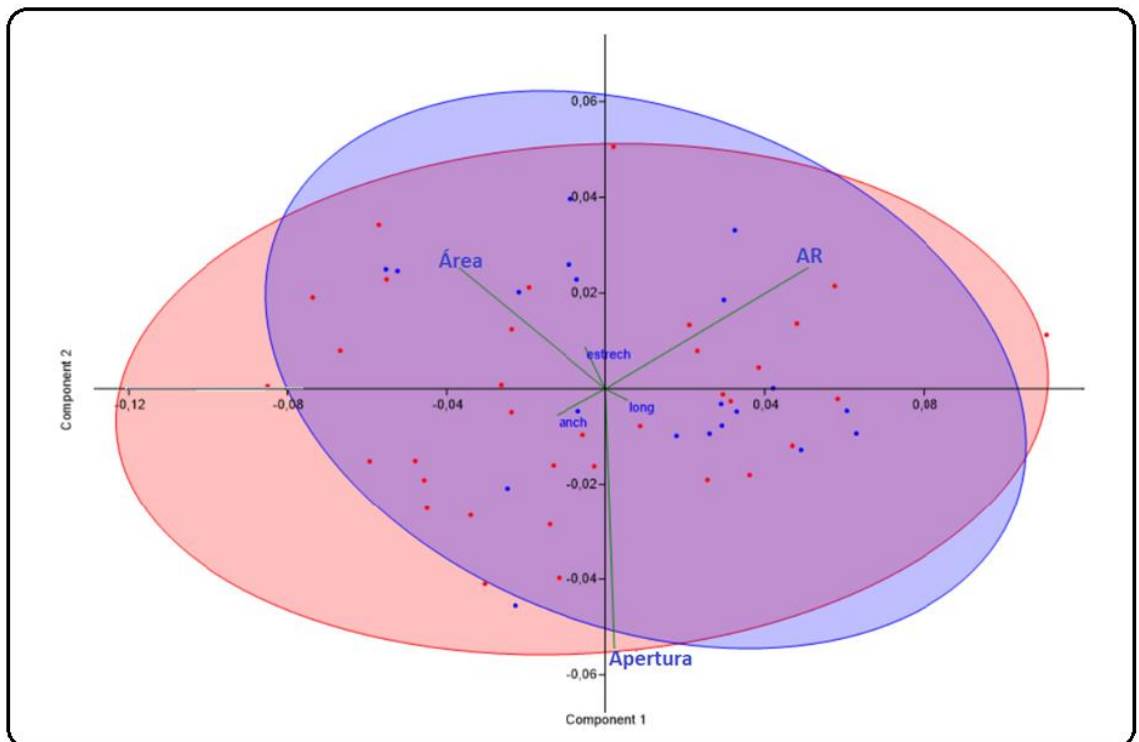


**Figura18.2:** Gráficos de cajas (media —, percentiles  $\square$  y outliers  $\circ$ ) de las distintas variables del surco (Ancho, Largo, Área, Estrechamiento, Apertura y Ratio de aspecto) para los subconjuntos de “cultivo” (J) y “escape” (S).

El gráfico de PCA permitió diferenciar a simple vista los subconjuntos de “jaula” y “escapes” mediante elipses y mostró su grado de solapamiento. Al igual que en el caso de los descriptores, las elipses solapan en gran medida y su dispersión es similar (Figura19.1). Por otro lado, las variables: área, índice de aspecto (AR) y apertura rostrum-antirostrum poseen el mayor peso sobre los datos (Figura 19.2).



**Figura19.1:** PCA. Representación de los datos tomados del surco según el peso de sus componentes principales (variables). Diferenciación en subconjuntos de “cultivo/jaula” y “escapes”.

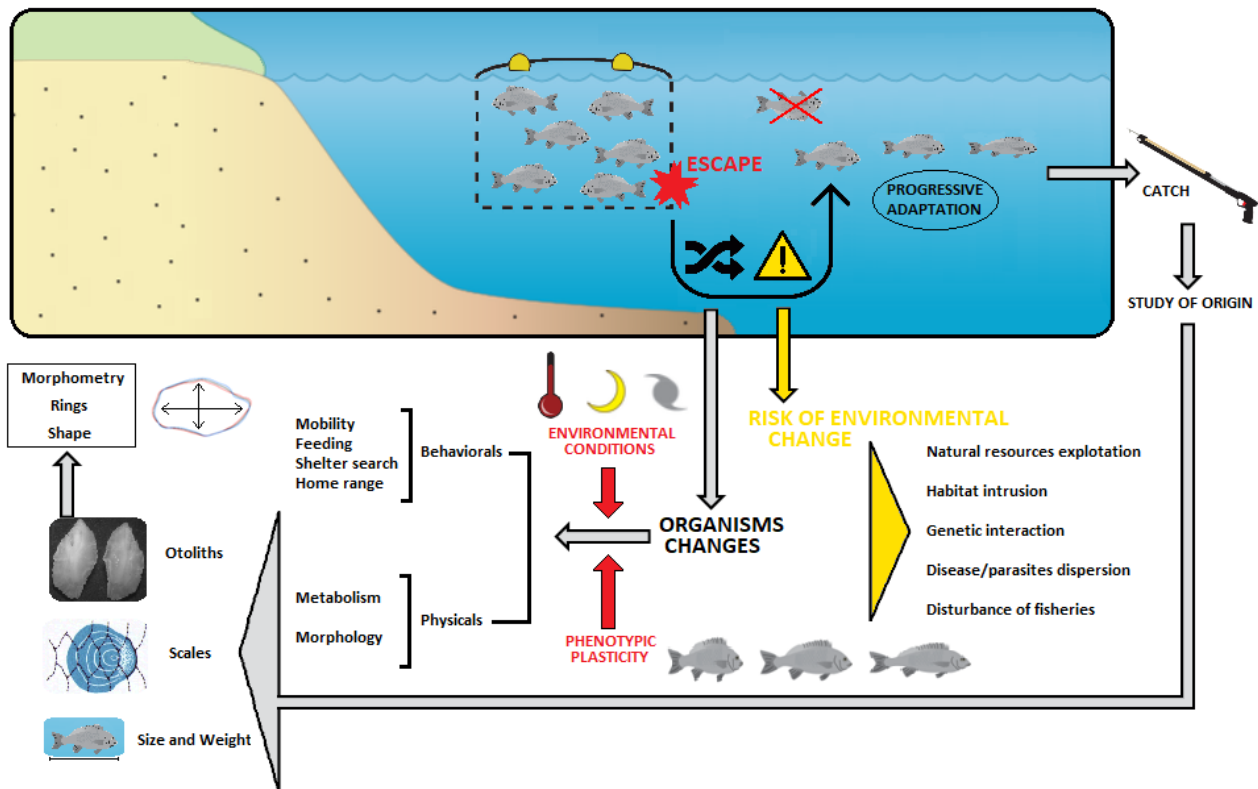


**Figura19.2:** PCA. Peso de las variables más influyentes sobre el perfil del surco y dirección.

## Discusión

El escape de peces de jaulas de cultivo puede suponer una amenaza para el hábitat natural en función de la magnitud del escape, la capacidad de la especie para explotar los recursos, su estado físico y su genética principalmente. Sin embargo, su transición al nuevo medio requiere y da lugar a cambios progresivos, tanto en su comportamiento

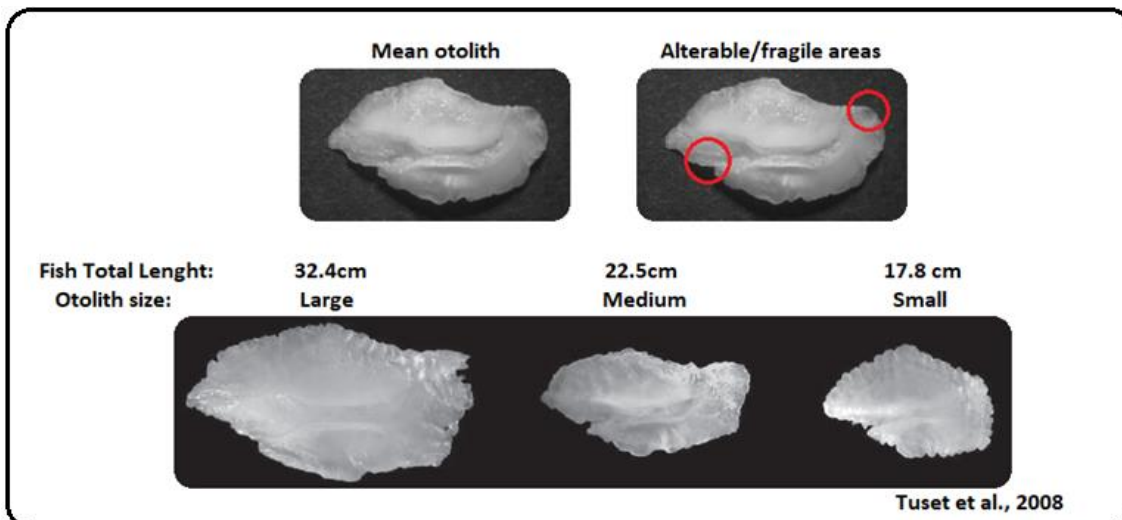
como en su organismo. En otras palabras, los peces deben superar un umbral de adaptación. Y dicho límite se encuentra fijado por las condiciones físicas, químicas y biológicas del medio. El éxito de la población escapada dependerá de su plasticidad fenotípica o, dicho de otro modo, de su aptitud para adecuar rasgos físicos a la imposición del medio. Las condiciones bajo las que un pez se encuentra sometido influyen en el desarrollo de su metabolismo y morfología externa. De igual manera intervienen en el crecimiento de estructuras duras como son las escamas o los otolitos. Comúnmente se emplean los anillos de dichas estructuras para datar transiciones de medio, cambios de estación o periodos de declive del organismo y, así, identificar su procedencia o su evolución. Considerando las estructuras duras internas como elementos relativamente estables, el contorno y la morfometría de los otolitos también podrían ser empleados para analizar el origen de un organismo. El presente estudio realiza una comparativa entre descriptores de contorno e índices morfométricos de otolitos de *S.aurata* de cultivo frente a otolitos de especímenes escapados con el fin de evaluar los posibles cambios en la estructura externa del sagittae debidos a la transición de medio de cultivo a medio silvestre y su calidad como trazador de origen (Figura21).



**Figura21:** Modelo conceptual explicativo. Proceso de escape, evolución e impacto y método de estudio del origen.

La curva de crecimiento evidencia diferencias respecto al índice talla-peso de las doradas dentro y fuera de las jaulas (Figura13A). Las doradas de cultivo generalmente poseen valores de peso superiores a las doradas escapadas para la misma talla. Lo mismo parece suceder con el peso del otolito, a pesar de la presencia de outliers (Figura13B). Sin embargo, el rango de tallas empleado induce un sesgo en cuanto a que no se utilizó un intervalo semejante en ambos conjuntos. La media de talla que se empleó para individuos escapados fue de  $25,3 \pm 4,8$  cm de longitud total, mientras que la media de talla empleada para doradas de cultivo fue de  $29 \pm 2,3$ cm. Por otro lado, los valores del coeficiente-*b* extraídos de la relación talla peso fueron 3,152 para doradas escapadas y 3,5462 para doradas de cultivo. La media de talla de doradas escapadas y su índice talla-peso se asemejan a los empleados en otros estudios del Atlántico y Mediterráneo, los cuales trabajaron con medias de entre 21 y 35cm de longitud total y coeficientes *b* comprendidos entre 2.62 y 3.22 (Lasserre y Labourg, 1974; Kraljević, y Dulčić, 1997; Fahy *et al.*, 2005; Chaoui *et al.*, 2006; Aykol y Gmsiz, 2011). En el caso de las doradas cultivadas, tanto la talla como el coeficiente *b* son superiores, aspecto que resulta coherente teniendo en cuenta que los ejemplares de cultivo poseen curvas de crecimiento más acusadas y morfologías más anchas que largas (Eaton, 1996; Arechavala *et al.*, 2012a). Asimismo, la relación de la talla con el peso del otolito parece indicar que su desarrollo está levemente ligado al aumento de la talla (Figura13B). No obstante, es posible que el crecimiento del otolito se encuentre influenciado en mayor medida por parámetros ambientales, ligado a sus funciones auditiva y estática (Popper *et al.*, 2005). Campana (2004) anota que las especies con individuos de mayor tamaño no tienen por qué poseer los otolitos más grandes. Sin embargo, puede resultar interesante el estudio de la relación entre el tamaño del otolito y la variación de factores físicos para individuos de una misma especie.

Respecto al análisis de contorno, comparando las imágenes en planta de los otolitos (Figura20) y el patrón medio de perfil obtenido con Shape (Figura15), se probó que el contorno de los otolitos estudiados resulta similar al detallado en guías como Tuset *et al.* (2008). La mayoría de los otolitos analizados pertenecieron a la morfología de talla media (Figura20A). Se diferenciaron las zonas del otolito más frágiles y susceptibles a mellas y fracturas. Dichas alteraciones son capaces de producir errores en el análisis de contorno o llevar a interpretaciones incorrectas.



**Figura20:** Otolito medio del presente estudio, regiones de la cara interna del otolito identificadas como las más variables y evolución morfológica del otolito según la talla (por Tuset *et al.*, 2008).

Se halló que los perfiles de los otolitos de peces escapados no presentaban diferencias acusadas respecto a los perfiles de peces de cultivo. No obstante, sí es posible percibir a simple vista cierta distinción entre las tres elipses solapadas (Figura14). La elipse de “escapes” posee una dispersión mayor, englobando las otras dos. Este aspecto puede encontrarse relacionado con el diseño de muestreo del estudio; se tomaron doradas cultivadas de 2 jaulas (una situada al este de Tenerife y otra al oeste). Por el contrario, los ejemplares escapados pueden provenir tanto de estas jaulas como de otras que no se muestrearon, y cuyos otolitos pueden tener características morfométricas distintas. Este aspecto puede condicionar en gran medida la diferencia de dispersión de los datos pertenecientes a las elipses de cultivo frente a los datos de la elipse de escapes. Mientras los individuos de cada subconjunto de cultivo se encuentran sometidos a condiciones similares, los escapados poseen un origen diferente y están expuestos a condiciones distintas; situación estudiada en detalle por Arechavala *et al.* (2012c) para doradas de cultivo y doradas salvajes.

Teniendo en cuenta la naturaleza sólida del otolito de dorada, resultaría razonable que estructura externa, en el caso de sufrir un proceso de transformación, fuese lento e influenciado en gran medida por la variabilidad de condiciones del ambiente y su origen genético (Campana *et al.*, 1993; Cardinale *et al.*, 2004). También es posible que los otolitos definan sus características morfológicas durante los primeros estadios de vida de la dorada, siguiendo posteriormente un crecimiento lineal en relación a la longitud del organismo (Wright *et al.*, 1990). No obstante, el modelo de crecimiento puede resultar muy distinto en función del género objetivo (Molony y Choat, 1990; Tzeng, 1990;

Metcalfé *et al.*, 1992; Lombarte y Lleonart, 1993; Otterlei *et al.*, 2002). Otro punto que destacar acerca del gráfico de PCA es la ligera diferenciación entre las elipses de ambas jaulas de cultivo. Dicha distinción podría ser atribuida a la propia situación geográfica de las jaulas (J1-oeste y J2-este; Figura 7) y a aspectos como la nutrición (Campana, 1983), la genética (Murayama *et al.*, 2005) u otros como las corrientes, la temperatura o la profundidad (Lombarte y Lleonart, 1993). Es interesante contemplar la hipótesis de diferente origen de los escapes y diferentes condiciones impuestas por el medio a modo de justificación de la dispersión de contornos.

En cuanto a los descriptores de contorno y peso, no se encontraron diferencias significativas para ninguna variable. Este hecho puede ser justificado nuevamente con la naturaleza sólida del otolito y su situación protegida como estructura interna o bien considerando que no ha transcurrido el tiempo suficiente desde el escape como para apreciar diferencias en cuanto a los descriptores de contorno. Encontramos una desviación típica mayor en el subconjunto “escapes”. El número de réplicas en escapes también es superior. Sin embargo, puede relacionarse con la variabilidad encontrada en el estudio de análisis de contorno y con la hipótesis del origen diferente. El análisis de componentes principales muestra las dos elipses de datos solapando, con dispersión similar. No se aprecia una diferenciación clara de los grupos “escapes” y “jaula”.

Considerar la edad y estadíos (Wright *et al.*, 1990) o dividir los otolitos según la talla (Tuset *et al.*, 2008) ayudaría a evaluar la situación con más precisión, permitiendo diferenciar en detalle la procedencia de los individuos. Por otro lado, el porcentaje de correcta clasificación arrojado por el análisis discriminante (70% para cultivo y 60.6% para escapes) es inferior al de Arechavala *et al.* (2012a), donde, utilizando una metodología similar, alcanzan índices de acierto de entre 89.5 y 95.7%. No obstante, es necesario tener en cuenta que el número de réplicas empleadas también es superior.

Con relación al análisis del surco acústico, los test estadísticos tampoco permitieron hallar diferencias significativas. No obstante, parece que los valores de las variables pertenecientes al subconjunto “escapes” son relativamente superiores en su mayoría. El aumento de las variables morfométricas del surco implica una apertura y alargamiento de este, aspecto que puede encontrarse relacionado con el acondicionamiento al nuevo régimen del medio (Campana y Neilson, 1982) y estrechamente ligado al comportamiento y a la necesidad auditiva (Morales-Nin, 2000). Sin embargo, Iversen (1967) anota que los grandes pelágicos como los túnidos poseen pequeños otolitos y Popper *et al.* (2005) sugiere que el tamaño del otolito se encuentra inversamente relacionado con la capacidad

de audición del organismo. No obstante, sería necesario estudiar la relación entre el crecimiento del otolito y el desarrollo del surco acústico. Por otro lado, Chao (1978) y Ramcharitar et al. (2004) encuentran diferencias significativas entre la profundidad del surco de diferentes especies de la familia Sciaenidae. Resultaría de interés tener en cuenta dicha variable en futuros estudios.

## **Conclusiones**

1. Los resultados obtenidos en el presente estudio muestran la estructura externa del otolito de dorada como sólida y relativamente estable frente a transiciones de medio de cultivo a medio salvaje, al menos durante el periodo de escape estudiado (0 a 6 años de vida libre). Este hecho lo convierte en un posible trazador biológico de calidad en *Sparus aurata*.
2. Con relación a los descriptores de contorno, parece que el área y el perímetro son las variables que producen mayores diferencias entre los datos (Figura17.2). Asimismo, el área y la apertura rostrum-antirostrum son las variables que producen mayores diferencias en los datos de surco (Figura19.2). No obstante, es aconsejable realizar la diferenciación de otolitos por contorno teniendo en cuenta el efecto de todos los descriptores a fin de poseer una perspectiva de los cambios en distintas dimensiones. Resultaría necesario evaluar el efecto de diferentes condiciones físicas y biológicas sobre cada uno de los descriptores a largo plazo.
3. Respecto al grado de plasticidad fenotípica del otolito de doradas cultivadas, no se encontraron diferencias significativas en el estudio estadístico de variables ligadas al perfil. No obstante, los valores de datos pertenecientes a los otolitos de individuos escapados solían presentar medias y desviaciones típicas aparentemente mayores. Además, la curva de talla-peso del otolito mostró una dispersión de datos alta. Esta tendencia se achaca a las características de origen de los individuos por el que los peces de cada jaula cultivo provienen de la misma línea genética y están sometidos a las mismas condiciones, mientras que los escapados provienen de jaulas diferentes y sufren condiciones del medio diferentes según el alcance del escape. Una posible mejora, a fin de comprobar dicha hipótesis, podría ser considerar el efecto del origen genético, edad de fuga y dispersión del escape.



4. Por último, tampoco se halló disimilitud entre los surcos acústicos de ejemplares de cultivo y ejemplares del medio salvaje. En el caso del análisis del surco acústico, resulta necesario e interesante el estudio de cambios en su profundidad.

Como síntesis, el otolito ha resultado ser una estructura dura sólida de baja plasticidad fenotípica. Dichas características dotan a su morfología externa de un alto interés como parámetro de estudio a la hora de definir el origen del organismo. Su morfología puede ser detallada empleando descriptores de contorno y técnicas de morfometría de perfiles. La variabilidad de dichos descriptores dependerá en gran medida de la genética del organismo y de su edad, aunque no es posible descartar el efecto de las condiciones del medio a largo plazo. Es necesario realizar un estudio comparativo acerca de la relación de distintas líneas genéticas con la morfología externa del otolito. Por otro lado, aunque la región del surco acústico es considerada como posiblemente susceptible a cambios ambientales debido a su funcionalidad, tampoco permitió encontrar diferencias significativas en los peces escapados. El análisis de este puede resultar una metodología a tener en cuenta en especies puntuales como base o complementando al análisis del contorno.

El establecimiento de patrones de perfil de sagittae asociados a granjas de acuicultura o poblaciones de peces aisladas podría permitir estudios rápidos y de bajo costo acerca del origen de individuos escapados o desplazados. El análisis de contorno puede combinarse con técnicas de marcaje químico o térmico, mejorando su efectividad o emplearse por separado como técnica de bajo costo o alternativa para especies débiles frente a marcajes agresivos. No obstante, un cotejado de perfiles de calidad requiere de un estudio previo de descriptores de contorno para la población objetivo.

## **Conclusions**

1. Results resumed in the present research show the otolith external structure as solid and relatively steady versus environmental changes (from culture cages to wild), at least during the studied period (from 0 to 6 wild life years). This fact shows the potential of the otolith shape as a quality biological tracer in *Sparus aurata*.
2. Related to shape descriptors, it seems area and perimeter are the variables that produce major differences between the data (Figure17.2). Likewise, area and rostrum-antirostrum aperture are the variables that produce greater differences between groove's data (Figure19.2). However, we suggest the use of all shape

descriptors for otolith contrast analysis because this way provides a broader perspective of contour changes. Nevertheless, it is necessary to evaluate long-term effects of physical and biological conditions into each shape descriptor.

3. About cultured sea bream otolith phenotypic plasticity degree, no significant differences were found in the statistical study of contour variables. Although, data values belonging to escaped individuals otoliths used to show means and typical deviation apparently higher. Moreover, size-weight curves showed a high data dispersion. This trend is explained by origin and genetic characteristics, why culture fishes belong to the same genetic line and are subject to the same environmental conditions, while escaped sea breams can belong to different cages and are subject to varied environmental conditions according to escape dispersion. A possible improvement, aiming to prove that hypothesis, could be consider genetic origin, age of escape and escape dispersion as factors.
4. By last, neither dissimilarity was found between cultured specimens acoustic grooves and those of wild environment specimens. In particular, in the groove analysis would be essential and interesting the study of groove's depth.

To sum up, the otolith has turned to be a solid and low phenotypic plasticity hard structure. This characteristics give its external morphology a high value as differentiation parameter in organisms origin studies. Its morphology can be detailed using shape descriptors and shape morphometry methods. The variability of these descriptors will depend a lot on organism genetics and age, even though, it's not possible to discard long-term environmental conditions effects. It is necessary to carry out a comparative study about the relationship of different genetic lines with otolith external morphology.

On the other hand, despite the acoustic groove region is considered as possibly susceptible to environmental changes due to its function, it also did not allow to find significant differences in the escaped fishes. Groove analysis could suppose an interesting methodology for specific species as a base study or supporting shape analysis.

Establishment of profile patterns of sagittae associated with aquaculture farms or isolated fish populations could allow quick and low-cost studies about the origin of escaped or displaced fishes. The contour analysis can be combined with chemical or thermal marking techniques, improving its effectiveness. In addition, it can be used separately as a rapid method or as an alternative for species not tolerant to aggressive markers. However, a right an quality comparison requires a previous study of contour descriptors for the target population.

## **Bibliografía**

- Akyol, O. and Gamsiz, K. (2011).** Age and growth of adult gilthead seabream (*Sparus aurata* L.) in the Aegean Sea. Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom, 91, 6: 1255-1259.
- Arechavala-Lopez, P., Sanchez-Jerez, P., Bayle-Sempere, J. T., Sfakianakis, D. G. and Somarakis, S. (2012a).** Discriminating farmed gilthead sea bream *Sparus aurata* and European sea bass *Dicentrarchus labrax* from wild stocks through scales and otoliths. Journal of fish biology, 80, 6: 2159-2175.
- Arechavala-Lopez, P., Uglen, I., Fernandez-Jover, D., Bayle-Sempere, J. T. and Sanchez-Jerez, P. (2012b).** Post-escape dispersion of farmed sea bream (*Sparus aurata* L.) and recaptures by local fisheries in the western Mediterranean Sea. Fisheries Research, (in press). doi: 10.1016/j.fishres.2012.02.003
- Arechavala-Lopez, P., Sanchez-Jerez, P., Bayle-Sempere, J. T., Sfakianakis, D. G. and Somarakis, S. (2012c).** Morphological differences between wild and farmed Mediterranean fish. Hydrobiologia 679, 217–231.
- Arechavala-Lopez, P., Milošević-González, M. and Sanchez-Jerez, P. (2016).** Using trace elements in otoliths to discriminate between wild and farmed European sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) and Gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.). International Aquatic Research, 8, 3: 263-273.
- Avigliano, E., Domanico, A., Sánchez, S. and Volpedo, A. V. (2017).** Otolith elemental fingerprint and scale and otolith morphometry in *Prochilodus lineatus* provide identification of natal nurseries. Fisheries research, 186, 1-10.
- Begg, G. A., Overholtz, W. J. and Munroe, N. J. (2001).** The use of internal otolith morphometrics for identification of haddock (*Melanogrammus aeglefinus*) stocks on Georges Bank. Fishery Bulletin, 1.
- Beveridge, M. C. M., Phillips, M. J. and Macintosh, D. J. (1997).** Aquaculture and the environment: the supply of and demand for environmental goods and services by Asian aquaculture and the implications for sustainability. Aquaculture research, 28, 10: 797-807.
- Bird, J. L., Eppler, D. T. and Checkley Jr, D. M. (1986).** Comparisons of herring otoliths using Fourier series shape analysis. Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences, 43, 6: 1228-1234.

- Boyd, C. E. and Clay, J. W. (1998).** Shrimp aquaculture and the environment. *Scientific American*, 278, 6: 58-65.
- Boyd CE, McNevin AA, Clay JW and Johnson HM. (2005).** Certification issues for some common aquaculture species. *Reviews in Fisheries Science* 13: 231–279.
- Brito, A., P. Pacual, J.M. Falcón, A. Sancho y G. González (2002).** Peces de la islas Canarias. Catálogo comentado e ilustrado.- Francisco Lemus Editor. La Laguna, 419pp.
- Brooks, K. M. and Jones, S. R. (2008).** Perspectives on pink salmon and sea lice: scientific evidence fails to support the extinction hypothesis. *Reviews in Fisheries Science*, 16, 4: 403-412.
- Campana, S. E. (1984).** Interactive effects of age and environmental modifiers on the production of daily growth increments in otoliths of plainfin midshipman, *Porichthys notatus*. *Fishery Bulletin*, 82, 1: 165.
- Campana, S.E. (1999).** Chemistry and composition of fish otoliths: pathways, mechanisms and applications. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 188: 263–297.
- Campana, S. E., and Neilson, J. D. (1982).** Daily growth increments in otoliths of starry flounder (*Platichthys stellatus*) and the influence of some environmental variables in their production. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 39, 7: 937-942.
- Campana, S. E., and Casselman, J. M. (1993).** Stock discrimination using otolith shape analysis. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 50, 5: 1062-1083.
- Canonico, G. C., Arthington, A., McCrary, J. K. and Thieme, M. L. (2005).** The effects of introduced tilapias on native biodiversity. *Aquatic Conservation: Marine and Freshwater Ecosystems*, 15, 5: 463-483.
- Cardinale, M., Doering-Arjes, P., Kastowsky, M., and Mosegaard, H. (2004).** Effects of sex, stock, and environment on the shape of known-age Atlantic cod (*Gadus morhua*) otoliths. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 61, 2: 158-167.
- Chao, L. N. (1978).** A basis for classifying western Atlantic Sciaenidae (Teleostei: Perciformes) NOAA Technical Report NMFS Circular 415 u.s. U.S. Government Printing Office: 1978, 797.733/21
- Chaoui, L., Kara, M. H., Faure, E. and Quignard, J. P. (2006).** Growth and reproduction of the gilthead seabream *Sparus aurata* in Mellah lagoon (north-eastern Algeria). *Scientia Marina*, 70, 3: 545-552.
- Clayton, J. W. (1981).** The stock concept and the uncoupling of organismal and molecular evolution. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 38: 1515- 1522.

- De Braux, E., Warren-Myers, F., Dempster, T., Fjellidal, P. G., Hansen, T. and Swearer, S. E. (2014).** Osmotic induction improves batch marking of larval fish otoliths with enriched stable isotopes. *Ices journal of marine science*, 71, 9: 2530-2538.
- Delgado, C. L., Wada, N., Rosegrant, M. W., Meijer, S. and Ahmed, M. (2003).** Fish to 2020: supply and demand in changing global markets. *The WorldFish Center Working Papers*. 333.95, 611-22.
- DeWitt, T. J., Sih, A. and Wilson, D. S. (1998).** Costs and limits of phenotypic plasticity. *Trends in ecology & evolution*, 13, 2: 77-81.
- Diana, J. S. (2009).** Aquaculture production and biodiversity conservation. *Bioscience*, 59, 1: 27-38.
- Eaton, D. R. (1997).** The identification and separation of wildcaught and cultivated sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Oceanographic Literature Review*, 6, 44: 627.
- Eckmann, R. and Rey, P. (1987).** Daily increments on the otoliths of larval and juvenile *Coregonus* spp., and their modification by environmental factors. *Hydrobiologia*, 148, 2: 137-143.
- Elder, K. L., Jones, G. A. and Bolz, G. (1996).** Distribution of otoliths in surficial sediments of the US Atlantic continental shelf and slope and potential for reconstructing Holocene fish stocks. *Paleoceanography*, 11, 3: 359-367.
- Eldson, T. S. and Gillanders, B. M. (2004).** Fish otolith chemistry influenced by exposure to multiple environmental variables. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 313(2), 269-284.
- Erickson, C. M. (1983).** Age determination of Manitoban walleyes using otoliths, dorsal spines, and scales. *North American Journal of Fisheries Management*, 3, 2: 176-181.
- Estoup, A., Jame, P. and Cornuet, J.-M. (2002).** Homoplasy and mutation model at microsatellite loci and their consequences for population genetics analysis. *Molecular Ecology* 11: 1591–1604.
- Fahy, E., Green, P. and Quigley, D. T. G. (2005).** Juvenile *Sparus aurata* L. on the south coast of Ireland. *Journal of Fish Biology*, 66, 1: 283-289.
- Falcón, J.M., A. Brito y G. González (2002).** Peces de la laguna de khnifiss (Sahara, NW de África) y de los sectores costeros próximos.- *Rev. de la Academia Canaria de Ciencias XIV*: 139-152.
- FAO, F. (2015).** PMA. 2015. El estado de la inseguridad alimentaria en el mundo 2015. Cumplimiento de los objetivos internacionales para 2015 en relación con el hambre: balance de los desiguales progresos.

- Fernandez-Jover, D. and Sanchez-Jerez, P. (2014).** Comparison of diet and otolith growth of juvenile wild fish communities at fish farms and natural habitats. *ICES Journal of Marine Science*, 72, 3: 916-929.
- Fleming I.A. and Einum S. (1997).** Experimental tests of genetic divergence of farmed from wild Atlantic salmon due to domestication. *ICES Journal of Marine Science* 54: 1051–1063.
- Fleming, I. A., Jonsson, B. and Gross, M. R. (1994).** Phenotypic divergence of sea-ranched, farmed, and wild salmon. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 51(12), 2808-2824.
- Gauldie, R. W. (1990).** How often is the von Bertalanffy-type length-at-age curve in fishes related to weight change artefacts interpreted as age rings in otoliths?. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology*, 96, 4: 451-458.
- Geffen, A. J. (1983).** The deposition of otolith rings in Atlantic salmon, *Salmo salar L.*, embryos. *Journal of fish biology*, 23, 4: 467-474.
- Geffen, A. J. (1992).** Validation of otolith increment deposition rate. *Canadian Special Publication of Fisheries and Aquatic Sciences*, 101, 113.
- Gilderhus, P. A. and Marking, L. L. (1987).** Comparative efficacy of 16 anesthetic chemicals on rainbow trout. *North American Journal of Fisheries Management*, 7, 2: 288-292.
- Glover, K. A., Pertoldi, C., Besnier, F., Wennevik, V., Kent, M. and Skaala, Ø. (2013).** Atlantic salmon populations invaded by farmed escapees: quantifying genetic introgression with a Bayesian approach and SNPs. *BMC genetics*, 14, 1: 74.
- Goldburg, R. and Naylor, R. (2005).** Future seascapes, fishing, and fish farming. *Frontiers in Ecology and the Environment*, 3, 1: 21-28.
- Gould, S. J. (1966).** Allometry and size in ontogeny and phylogeny. *Biological Reviews*, 41, 4: 587-638.
- Hagen, P., Munk, K., Van Alen, B. and White, B. (1995).** Thermal mark technology for inseason fisheries management: a case study. *Alaska Fishery Research Bulletin*, 2, 2: 143-155.
- Hammer, S. A. and Lee Blankenship, H. (2001).** Cost Comparison of Marks, Tags, and Mark-with-Tag Combinations Used in Salmonid Research. *North American Journal of Aquaculture*, 63, 2: 171-178.

- Hansen, L. P. and Jacobsen, J. A. (2003).** Origin and migration of wild and escaped farmed Atlantic salmon, *Salmo salar* L., in oceanic areas north of the Faroe Islands. *ICES Journal of Marine Science*, 60, 1: 110-119.
- Hare, J. A. (2002).** Otolith Applications in Reef Fish Ecology. *Coral Reef Fishes: Dynamics and Diversity in a Complex Ecosystem*, 243.
- Harvey, J. T., Loughlin, T. R., Perez, M. A. and Oxman, D. S. (2000).** Relationship between fish size and otolith length for 63 species of fishes from the eastern North Pacific Ocean. NOAA Technical Report NMFS 150 Technical Report of the Fishery Bulletin
- Hayes, F.R. and Livingstone, D.A. (1955).** The trout population of a Nova Scotia Lake as affected by habitable water, poisoning of the shallows and stocking. *J. Fish Res. Board. Can.* 12, 618–635.
- Hetch, T. (1987).** A guide to the otoliths of Southern Ocean fishes. *S. Afr. J. Antarct. Res.*, 17, 2-87.
- Informe de la Asociación Empresarial de Productores de Cultivos Marinos de España APROMAR, (2017)** La Acuicultura en España. ([www.apromar.cl](http://www.apromar.cl))(consultada el 15 de junio de 2018).
- Iversen, R. T. (1967).** Response of the yellowfin tuna (*Thunnus albacares*) to underwater sound. *Marine bioacoustics*, 2, 105-122.
- Iwata, H. and Ukai, Y. (2002).** SHAPE: a computer program package for quantitative evaluation of biological shapes based on elliptic Fourier descriptors. *Journal of Heredity* 93, 384–385.
- Izquierdo, M. S., Montero, D., Robaina, L., Caballero, M. J., Rosenlund, G. and Ginés, R. (2005).** Alterations in fillet fatty acid profile and flesh quality in gilthead seabream (*Sparus aurata*) fed vegetable oils for a long-term period. Recovery of fatty acid profiles by fish oil feeding. *Aquaculture*, 250, 1-2: 431-444.
- Izquierdo-Gómez, D., Arechavala-Lopez, P., Bayle-Sempere, J. T. and Sánchez-Jerez, P. (2017).** Assessing the influence of gilthead sea bream escapees in landings of Mediterranean fisheries through a scale-based methodology. *Fisheries Management and Ecology*, 24, 1: 62-72.
- Jones, G. P., Milicich, M. J., Emslie, M. J. and Lunow, C. (1999).** Self-recruitment in a coral reef fish population. *Nature*, 402, 6763: 802.
- Kraljevic, M. and Dulcic, J. (1997).** Age and growth of gilt-head sea bream (*Sparus aurata* L.) in the Mirna Estuary, Northern Adriatic. *Fisheries research*, 31, 3: 249-255.

- Krkošek, M., Lewis, M. A., Volpe, J. P. and Morton, A. (2006).** Fish Farms and Sea Lice Infestations of Wild Juvenile Salmon in the Broughton Archipelago—A Rebuttal to. *Reviews in Fisheries Science*, 14, 1-2: 1-11.
- Lalumera, G. M., Calamari, D., Galli, P., Castiglioni, S., Crosa, G. and Fanelli, R. (2004).** Preliminary investigation on the environmental occurrence and effects of antibiotics used in aquaculture in Italy. *Chemosphere*, 54(5), 661-668.
- Lasserre, G. et Labourg, P. J. (1974).** Etude compare de la croissance de la daurade *Sparus aurata* L. des regions d'Archachon et de Sete. *Vie et Milieu*, 24, 155-170.
- Leonart, J., Salat, J. and Torres, G. J. (2000).** Removing allometric effects of body size in morphological analysis. *Journal of Theoretical Biology*, 205, 1: 85-93.
- Lombarte, A., and Leonart, J. (1993).** Otolith size changes related with body growth, habitat depth and temperature. *Environmental biology of fishes*, 37, 3: 297-306.
- Lorenzo, G. G., Brito, A. and Barquín, J. (2005).** Impactos provocados por los escapes de peces de las jaulas de cultivos marinos en Canarias. *Vieraea*, 33, 449-454.
- Lund, R. A. and Hansel, L. P. (1991).** Identification of wild and reared Atlantic salmon, *Salmo salar* L., using scale characters. *Aquaculture Research*, 22, 4: 499-508.
- Machias A., Karakassis I., Labropoulou M., Somarakis S., Papadopoulou K.N. and Papaconstantinou C. (2004).** Changes in wild fish assemblages after the establishment of a fish farming zone in an oligotrophic marine eco system. *Estuarine, Coastal and Shelf Science* 60: 771–779.
- McGinnity P., Stone C., Taggart J., Cooke D., Cotter D., Hynes R., McCamley C., Cross T. and Ferguson A. (1997).** Genetic impact of escaped farmed Atlantic salmon (*Salmo salar*) on native populations: Use of DNA profiling to assess freshwater performance of wild, farmed, and hybrid progeny in a natural river environment. *ICES Journal of Marine Science* 54: 998–1008.
- Metcalf, N. B., Wright, P. J., and Thorpe, J. E. (1992).** Relationships between social status, otolith size at first feeding and subsequent growth in Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Journal of Animal Ecology*, 585-589.
- Meyer, A. (1987).** Phenotypic plasticity and heterochrony in *Cichlasoma managuense* (Pisces, cichlidae) and their implication for speciation in cichlid fishes. *Evolution* 41: 1357-1369.
- Miller, S. J. and Storck, T. (1984).** Temporal spawning distribution of largemouth bass and young-of-year growth determined from daily otolith rings. *Transactions of the American Fisheries Society*, 113, 5: 571-578.



- Mohler, J.W. (2003).** Producing fluorescent marks on Atlantic salmon fin rays and scales with calcein via osmotic induction. *N. Am. J. Fish. Manage.* 23, 1108–1113.
- Molony, B. W., and Choat, J. H. (1990).** Otolith increment widths and somatic growth rate: the presence of a time-lag. *Journal of Fish Biology*, 37,4: 541-551.
- Morales-Nin, B. (2000).** Review of the growth regulation processes of otolith daily increment formation. *Fisheries Research*, 46, 1-3: 53-67.
- Morita, K., Takahashi, S., Ohkuma, K. and Nagasawa, T. (2013).** Estimation of the proportion of wild chum salmon *Oncorhynchus keta* in Japanese hatchery rivers. 79, 206–213.
- Munro, A. R., Gillanders, B. M., Elsdon, T. S., Crook, D. A. and Sanger, A. C. (2008).** Enriched stable isotope marking of juvenile golden perch (*Macquaria ambigua*) otoliths. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 65, 2: 276-285.
- Murayama, E., Herbomel, P., Kawakami, A., Takeda, H., and Nagasawa, H. (2005).** Otolith matrix proteins OMP-1 and Otolin-1 are necessary for normal otolith growth and their correct anchoring onto the sensory maculae. *Mechanisms of development*, 122, 6: 791-803.
- Negus, M.T. and Tureson, F.T. (2004).** Retention and nonlethal external detection of calcein marks in rainbow trout and Chinook salmon. *N. Am. J. Fish. Manage.* 24, 741–747.
- Neilson, J. D. and Geen, G. H. (1982).** Otoliths of chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*): daily growth increments and factors influencing their production. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 39, 10: 1340-1347.
- Nolf, D. (1995).** Studies on fossil otoliths — the state of the art. In *Recent Developments in Fish Otolith Research*. Edited by D.H. Secor, J.M. Dean, and S.E. Campana. University of South Carolina Press, Columbia, SC. p. 513–544.
- Otterlei, E., Folkvord, A., and Nyhammer, G. (2002).** Temperature dependent otolith growth of larval and early juvenile Atlantic cod (*Gadus morhua*). *ICES Journal of Marine Science*, 59, 4: 851-860.
- Popper, A.N. and Fay, R.R. (1997).** Evolution of the ear and hearing: issues and questions. *Brain Behav. Evol.* 50, 13: 221.
- Popper, A.N. and Lu, Z. (2000).** Structure–function relationships in fish otolith organs. *Fish. Res.* 46: 15–25.

- Popper, A. N., Ramcharitar, J. and Campana, S. E. (2005).** Why otoliths? Insights from inner ear physiology and fisheries biology. *Marine and freshwater Research*, 56, 5: 497-504.
- Pothin, K., Gonzalez-Salas, C., Chabanet, P. and Lecomte-Finiger, R. (2006).** Distinction between *Mulloidichthys flavolineatus* juveniles from Reunion Island and Mauritius Island (south-west Indian Ocean) based on otolith morphometrics. *Journal of Fish Biology*, 69, 1: 38-53.
- Price, I. M. and Nickum, J. G. (1995).** Aquaculture and birds: the context for controversy. *Colonial Waterbirds*, 33-45.
- Primavera, J. H. (1999).** Mangroves and aquaculture in Southeast Asia. *Ecol. Econ*, 29, 235-252.
- Ramcharitar, J. U., Deng, X., Ketten, D. and Popper, A. N. (2004).** Form and function in the unique inner ear of a teleost: the silver perch (*Bairdiella chrysoura*). *Journal of Comparative Neurology*, 475, 4: 531-539.
- Ramírez-Pérez, J. S., Quiñonez-Velazquez, C., Garcia-Rodriguez, F. J., Felix-Uraga, R. and Melo-Barrera, F. N. (2010).** Using the shape of sagitta otoliths in the discrimination of phenotypic stocks in *Scomberomorus sierra* (Jordan and Starks, 1895). *Journal of fisheries and aquatic Science*, 5, 2: 82-93.
- Riddell, B. E. and Leggett, W. C. (1981).** Evidence of an adaptive basis for geographic variation in body morphology and time of downstream migration of juvenile Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 38, 3: 308-320.
- Schroder, S. L., Knudsen, C. M. and Volk, E. C. (1995).** Marking salmon fry with strontium chloride solutions. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 52(6), 1141-1149.
- Secor, D. H., White, M. G. and Dean, J. M. (1991).** Immersion marking of larval and juvenile hatchery-produced striped bass with oxytetracycline. *Transactions of the American Fisheries Society*, 120, 2: 261-266.
- Shepherd, G. (1991)** Meristic and morphometric variation in Black Sea Bass North of Cape Hatteras, North Carolina. *Am. J. Fish. Manag.* 11: 139-149.
- Sola, L., Moretti, A., Crosetti, D., Karaiskou, N., Magoulas, A., Rossi, A. R. and Tsigenopoulos, C. S. (2006).** Gilthead seabream—*Sparus aurata*. In *Proceedings of the WP1 workshop on Genetics of domestication, breeding and enhancement of performance of fish and shellfish*. 12-17pp.

- Soto D. and Norambuena F. (2004).** Evaluation of salmon farming effects on marine systems in the inner seas of southern Chile: A large-scale mensurative experiment. *Journal of Applied Ichthyology* 20: 493–501.
- Sponaugle, S. (2010).** Otolith microstructure reveals ecological and oceanographic processes important to ecosystem-based management. *Environmental Biology of Fishes*, 89, 3-4: 221-238.
- Steinmetz, B. and Müller, R. (1991).** An atlas of fish scales and other bony structures used for age determination: non-salmonid species found in European fresh waters. Samara Publishing Ltd., 212pp.
- Stevenson, D. K. and Campana, S. E. (1992).** Department of Fisheries and Oceans. Otolith microstructure examination and analysis 126pp.
- Stubbing, D.N. and Moss, R.D. (2007).** Success of calcein marking via osmotic induction in brown trout fry, *Salmo trutta*. *Fish. Manage. Ecol.* 14, 231–233.
- Sturrock, A. M., Trueman, C. N., Darnaude, A. M. and Hunter, E. (2012).** Can otolith elemental chemistry retrospectively track migrations in fully marine fishes? *Journal of Fish Biology*, 81, 2: 766-795.
- Swaine, D. P., Ridell, B. E. and Murray, C. B. (1991).** Morphological differences between hatchery and wild populations of coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*): environmental versus genetic origin *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 48: 1783-1791.
- Tanaka, K., Mugiya, Y. and Yamada, J. (1981).** Effects of Photoperiod and Feeding on Daily Growth Patterns in Otoliths of Juvenile *Tilapia nilotica*. *FISH. BULL. SEATTLE.*, 79(3), 459-466.
- Taubert, B. D., and Coble, D. W. (1977).** Daily rings in otoliths of three species of *Lepomis* and *Tilapia mossambica*. *Journal of the Fisheries Board of Canada*, 34, 3: 332-340.
- Tavolga, W. N., Popper, A. N., and Fay, R. R. (1981).** Hearing and sound communication in fishes. Springer Science & Business Media. 105pp.
- Thorrold, S. R., Jones, G. P., Planes, S. and Hare, J. A. (2006).** Transgenerational marking of embryonic otoliths in marine fishes using barium stable isotopes. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 63, 6: 1193-1197.
- Toledo, K. (2013).** Asilvestramiento de los peces introducidos por la acuicultura and sus efectos ecológicos potenciales: el caso de la lubina, "*Dicentrarchus labrax*" (Linnaeus, 1758), escapada en las Islas Canarias. Tesis doctoral Universidad de La Laguna, 220pp.

- Tracey, S. R., Lyle, J. M., and Duhamel, G. (2006).** Application of elliptical Fourier analysis of otolith form as a tool for stock identification. *Fisheries Research*, 77, 2: 138-147.
- Triantafyllidis, A., Leonardos, I., Bista, I., Kyriazis, I. D., Stoumboudi, M. T., Kappas, I., ... and Abatzopoulos, T. J. (2007).** Phylogeography and genetic structure of the Mediterranean killifish *Aphanius fasciatus* (Cyprinodontidae). *Marine Biology*, 152, 5: 1159-1167.
- Turan, C. (1999).** A note on the examination of morphometric differentiation among fish populations: the truss system. *Turkish Journal of Zoology*, 23(3), 259-264.
- Tuset, V. M., Lombarte, A., & Assis, C. A. (2008). Otolith atlas for the western Mediterranean, north and central eastern Atlantic. *Scientia Marina*, 72, S1: 7-198.
- Tzeng, W. N. (1990).** Relationship between growth rate and age at recruitment of *Anguilla japonica* elvers in a Taiwan estuary as inferred from otolith growth increments. *Marine Biology*, 107, 1: 75-81.
- Vander Haegen, G.E., Blankenship, H.L., Hoffmann, A. and Thompson, D.A. (2005).** The effects of adipose fin clipping and coded wire tagging on the survival and growth of spring chinook salmon. *N. Am J. Fish. Manage.* 25, 1161–1170.
- Wainwright, P. C. (1996).** Ecological explanation through functional morphology: the feeding biology of sunfishes. *Ecology*, 77(5), 1336-1343.
- Warren-Myers, F., Ingram, B. A., Dempster, T., and Swearer, S. E. (2018).** Enriched stable isotope marking of hatchery trout via immersion: A method to monitor restocking success. *Fisheries Research*, 197, 78-83.
- Winans, G. A. (1984).** Multivariate Morphometric Variability in Pacific Salmon - Technical Demonstration. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 41: 1150-1159.
- Winans, G. A. (1985).** Using morphometric and meristic characters for identifying stocks of fish. In *Proceedings of the Stock Identification Workshop*. Panama City Beach, Florida. 5-7pp.
- Wright, P. J., Metcalfe, N. B. and Thorpe, J. E. (1990).** Otolith and somatic growth rates in Atlantic salmon parr, *Salmo salar* L: evidence against coupling. *Journal of Fish Biology*, 36, 2: 241-249.