



UNIVERSIDAD DE CHILE

MAGISTER EN CIENCIAS DE LA ACUICULTURA

“EVALUACIÓN DE LA INTERACCIÓN GENOTIPO-AMBIENTE PARA CRECIMIENTO DE SALMÓN DEL ATLÁNTICO (*Salmo salar*) CRIADOS EN AGUA DE MAR Y AGUA DULCE”

Tesis presentada para optar al Grado de Magíster en Ciencias de la Acuicultura

Claudina Carmen González Huerta

Director de Tesis
Dr. José Manuel Yáñez

SANTIAGO – CHILE
2018

UNIVERSIDAD DE CHILE

MAGISTER EN CIENCIAS DE LA ACUICULTURA



“EVALUACIÓN DE LA INTERACCIÓN GENOTIPO-AMBIENTE PARA CRECIMIENTO DE SALMÓN DEL ATLÁNTICO (*Salmo salar*) CRIADOS EN AGUA DE MAR Y AGUA DULCE”

Tesis presentada para optar al Grado de Magíster en Ciencias de la Acuicultura

Claudina Carmen González Huerta

Director de Tesis
Dr. José Manuel Yáñez

Profesores consejeros
Federico Emilio Winkler Manns
David Véliz Baeza
Nelson F. Díaz

SANTIAGO – CHILE
2018

Índice de contenido

INTRODUCCIÓN	1
HIPÓTESIS	4
OBJETIVOS	4
Objetivo General.....	4
Objetivos Específicos	4
MATERIALES Y MÉTODOS.....	5
Programa de Familias	5
Medio ambiente	8
Estructuración de la información.....	8
Análisis estadístico	9
Estadística de resumen	9
Modelos	9
Estimación de heredabilidad.....	10
Cálculo de correlación genética.....	11
RESULTADOS	13
Estadística descriptiva	13
Prueba de cociente de verosimilitud (LRT).....	13
Heredabilidad.....	14
Correlación Genética	15
DISCUSIÓN	16
CONCLUSIONES	19
LITERATURA CITADA.....	20

Índice de cuadros

Cuadro 1. Número de peces marcados por grupo y clase anual	6
Cuadro 2. Estadística descriptiva de crecimiento en salmón del Atlántico (<i>S. salar</i>) por grupo y clase anual (Mín: Mínimo; Máx: Máximo; D.E.: Desviación estándar; CV: Coeficiente de variación).....	13
Cuadro 3. Resultados prueba de cociente de verosimilitud para efecto ambiente común (LRT) en peso adulto.....	14
Cuadro 4. Estimación de heredabilidad (h^2), varianza fenotípica (V_P), varianza aditiva(V_A), coeficiente de variación de varianza aditiva (CV_A) y varianza residual (V_R) para el carácter peso a cosecha en salmón del Atlántico (<i>S. salar</i>) en dos clases anuales	14
Cuadro 5. Estimación de correlación genética para peso adulto en salmón del Atlántico (<i>S. salar</i>) en dos clases anuales	15

Índice de Figuras

Figura 1. Representación gráfica de la interacción genotipo-ambiente. 1 y 2 representan dos genotipos en distintos ambientes; a y b representan interacción, mientras c y d no representan interacción genotipo-ambiente.	2
Figura 2. Esquema del programa de familias salmón del Atlántico (<i>S. salar</i>).....	7

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a mi director de tesis José Manuel Yáñez, por su colaboración y orientación al trabajo realizado, también a los profesores de la comisión de tesis Sr. Federico Winkler M. y Sr. David Vélez B. por su buena disposición y consejos y a Pablo Dufflocq, por su colaboración en el proceso y análisis de datos.

RESUMEN

A partir de la crisis del virus ISA ocurrida en Chile en el año 2007, el cultivo del salmón experimentó un giro considerable en las prácticas y regulaciones de cultivo. Estos cambios fueron implementados en toda la cadena de producción y, por supuesto, en la reproducción. En la actualidad el ciclo reproductivo del salmón del Atlántico (*Salmo salar*) se desarrolla completamente en agua dulce, incluyendo la etapa de engorda. Se hace necesario conocer si el desempeño genético del crecimiento de los peces que se engordan en agua dulce es igual o diferente a los que se engordan en el mar. El objetivo de este estudio fue evaluar la existencia de interacción genotipo-ambiente para crecimiento corporal en dos cohortes independientes de salmón del Atlántico (clase anual 2012 y 2014), criados en agua de mar y agua dulce. Para ello se estimaron las heredabilidades y las correlaciones genéticas para peso corporal en ambos ambientes a partir de un modelo animal lineal bivariado, a través del software ASREML (Gilmour *et al.*, 2009).

Las heredabilidades estimadas en ambos ambientes fueron de moderadas a altas $0,23 \pm 0,04$ a $0,46 \pm 0,08$, constituyendo magnitudes que indican que es factible mejorar el carácter peso corporal a través de selección genética. Las correlaciones genéticas para peso corporal entre ambos ambientes fueron bajas: $0,31 \pm 0,13$ para la clase anual 2012 y $0,26 \pm 0,14$ para la clase 2014. Esto indica que existe una considerable interacción genotipo-ambiente para el carácter crecimiento en ambas condiciones de cultivo. Estos resultados indican que la selección de reproductores para crecimiento corporal en agua dulce no presentará la eficiencia esperada en peces criados en agua de mar, debido a un reordenamiento de los reproductores de acuerdo con su mérito genético medido en ambos ambientes.

Palabras claves: correlaciones genéticas; genotipos; heredabilidades; *Salmo salar*

ABSTRACT

From the ISA virus crisis occurred in Chile in 2007, considerable modifications related to practices and regulations for farming were experienced by salmon industry. These changes were implemented throughout the whole productive chain and, of course, in reproduction. Atlantic salmon (*Salmo salar*) reproductive cycle, including ongrowing up to adult size, is now completely carried out in fresh water. Fish growth genetic performance and existence of differences or similarities in fresh water compared to sea water is required. Present study objective was to evaluate genotype-environment interaction for body growth trait, in two Atlantic salmon independent populations (year class 2012 and 2014), reared in seawater and freshwater. Heritabilities and genetic correlations for body weight in both environments were estimated through a linear bivariate animal model, using ASREML software (Gilmour *et al.*, 2009).

Estimated heritabilities in both environments were moderate to high 0.23 ± 0.04 to 0.46 ± 0.08 , constituting magnitudes that indicating body weight trait improvement is feasible through genetic selection. The genetic correlations for body weight between both environments were low: 0.31 ± 0.13 for the year class 2012 and 0.26 ± 0.14 for the year class 2014. This indicates that there is a considerable genotype-environment interaction for the growth trait. These results indicate that broodstocks selection for body growth in fresh water will not present the expected efficiency in fish raised in sea water, due to a re-ranking of the broods according to their genetic value measured in both environments.

Keywords: genetic correlations; genotypes; heritabilities; *Salmo salar*

INTRODUCCIÓN

La producción acuícola mundial de salmón del Atlántico (*Salmo salar*) excedió los 2,3 millones de toneladas en el año 2014, según estadística de la FAO (FishStat, 2016). El salmón del Atlántico de cultivo constituye más del 90% del mercado de salmón cultivado a nivel mundial y más del 50% del mercado total global de salmón.

En Chile, la producción de salmón del Atlántico se desarrolla en la zona sur del país, principalmente entre las regiones de la Araucanía y de Magallanes y Antártica Chilena. Actualmente esta especie sustenta alrededor del 70% del total del salmón cultivado, llegando a una producción cercana a las 530 mil toneladas en el año 2016, con exportaciones de 380 mil toneladas, equivalentes a 2.955 millones de dólares FOB Chile (Sernapesca, 2016).

En el año 2007 la industria chilena se vio enfrentada a una de sus mayores crisis debido al efecto del virus ISA (Anemia Infecciosa del Salmón). Esta crisis indujo cambios regulatorios que incluyeron normativas sanitarias, nuevos reglamentos y programas de vigilancia que elevaron los estándares de manejo sanitario y productivo. Estos cambios fueron implementados en toda la cadena de producción, incluyendo la reproducción. Uno de los cambios más relevantes implementados apuntó a mantener los planteles de reproductores en agua dulce durante todo su ciclo de vida, impidiendo el proceso natural de engorda en agua de mar.

El éxito de la industria del salmón del Atlántico y trucha arco iris se ha propiciado en gran medida debido a una mejora en la productividad a través de la domesticación y la cría selectiva.

En un programa de selección genética el objetivo principal es incrementar el valor medio de los caracteres de importancia económica. Este cambio en la media poblacional debido a la selección es denominada ganancia genética. La ganancia genética es obtenida seleccionando reproductores para generar la próxima generación de individuos, los cuales tienen una mayor probabilidad de transmitir genes favorables a su descendencia (Gjedrem, 2012).

En acuicultura, las variables ambientales tales como el fotoperiodo, temperatura y sistemas de producción pueden influir significativamente en el desempeño del crecimiento de los peces a través de distintos ambientes de producción. Diferencias en las variables ambientales pueden inducir un fenómeno denominado interacción genotipo-ambiente (G*E) (Bangera *et al.*, 2015).

Según Gjedrem (2005), la interacción genotipo-ambiente puede en parte atribuirse a la sensibilidad de los animales a la variación de las condiciones ambientales. Condiciones ambientales distintas a aquellas en las que los animales se han adaptado, pueden permitir que

estos manifiesten su sensibilidad frente a estas, gatillando la expresión de interacción genotipo-ambiente. Por su parte Sae-Lim *et al.* (2013) mencionan que entre los principales factores que podrían causar situaciones potenciales de interacción genotipo-ambiente en los peces de cultivo serían: temperatura, salinidad, alimentación, manipulación y calidad de agua

La Figura 1 muestra una representación gráfica de la interacción genotipo-ambiente. Existe interacción genotipo-ambiente cuando el ambiente afecta de distinta forma a dos o más genotipos, pudiendo modificar las diferencias entre los grupos e incluso cambiar el orden de ellos (Figura 1 a y b). Desde el punto de vista estadístico, si las líneas tienen pendientes diferentes, existe presencia de interacción genotipo-ambiente (Falconer y Mackay, 2001). El caso contrario ocurre cuando la pendiente de las rectas es similar, donde se determina que no hay interacción genotipo-ambiente (Figura 1 c y d).

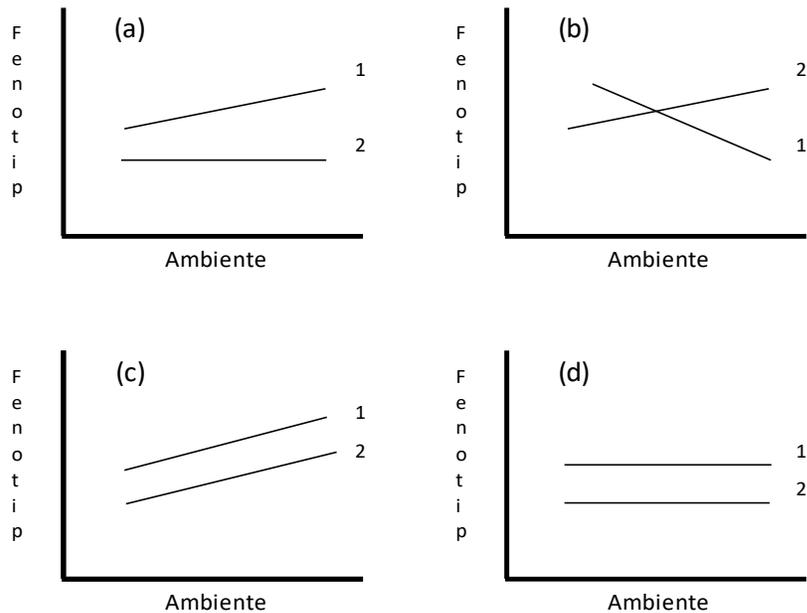


Figura 1. Representación gráfica de la interacción genotipo-ambiente. **1 y 2** representan dos genotipos en distintos ambientes; **a y b** representan interacción, mientras **c y d** no representan interacción genotipo-ambiente.

Según Gjedrem (2005), las causas biológicas de la interacción genotipo-ambiente son variadas (ejemplo tasa de crecimiento). Algunos genotipos se adaptan excepcionalmente bien a ciertos nichos mientras que otros lo hacen pobremente. Cuando el mejor genotipo en un ambiente no es el mejor en otro ambiente, se generan complicaciones al momento de seleccionar los animales de mayor mérito genético reduciendo la eficacia de la selección.

Desde el punto de vista metodológico, para la estimación de la interacción genotipo-ambiente

mediante la utilización de varios genotipos criados en diferentes ambientes, un análisis de varianza incluyendo el efecto del genotipo, del ambiente y de la interacción entre ambos, producirá estimaciones de la varianza entre genotipos, entre los ambientes, y varianza asociada a la interacción genotipo-ambiente. La importancia de la interacción puede ser evaluada como la proporción de la varianza fenotípica total asignada a la varianza explicada por la interacción. Si la variación debida a interacción genotipo-ambiente constituye sólo una pequeña proporción de la varianza fenotípica total, la interacción causará problemas menores en la estimación de los valores genéticos y en la identificación de los mejores reproductores en los distintos ambientes (Gjedrem, 2005).

Falconer y Mackay (1996) indican que la interacción genotipo-ambiente se refiere a un fenómeno en el cual diferentes genotipos tienen diferentes desempeños a través de macro-ambientes y que una medición adecuada para determinar la magnitud de esta interacción corresponde a la correlación genética entre el desempeño de los animales en dos o más ambientes diferentes. Una alta correlación genética indica una baja interacción genotipo-ambiente, es decir, los mismos genes, o en su defecto genes ligados, se encuentran afectando el carácter de manera similar en ambos ambientes.

Según Robertson (1959), no existe interacción genotipo-ambiente si la correlación genética es cercana a la unidad y sugirió un umbral de $r_g < 0.8$ para determinar la existencia de interacción genotipo-ambiente, considerando un error estándar cercano a 0.2 como mínimo absoluto.

Se han realizado diversos estudios de interacción genotipo-ambiente en diversas especies acuícolas. Sae-Lim *et al.* (2016) mencionan que desde los años 1964 al 2013, un total de 127 estudios fueron publicados sobre interacción genotipo-ambiente en especies acuícolas. Los estudios evaluaron la magnitud de la interacción genotipo-ambiente para diferentes cepas o estimaron parámetros genéticos para interacción genotipo-ambiente dentro de una población. Para salmón de Atlántico este autor menciona siete estudios, cuatro de los cuales se asocian al carácter crecimiento, no especificando existencia de interacción genotipo-ambiente para este carácter.

En la actualidad, en Chile la mayoría de las empresas que cuentan con programas de mejoramiento genético para la especie salmón del Atlántico desarrollan todo el ciclo de vida de los reproductores en agua dulce. Esto ha generado algunas incertidumbres respecto a si el desempeño de los peces que permanecen toda su vida en agua dulce es equivalente al de los peces que son trasladados al agua de mar en su etapa de engorda. Debido a esto es importante la evaluación de la interacción genotipo-ambiente y se hace necesario realizar la investigación y su evaluación.

El presente estudio apunta a evaluar la interacción genotipo-ambiente para el carácter crecimiento en dos ambientes de cultivo diferentes y el nivel de re-clasificación de genotipos superiores entre ambos ambientes.

HIPÓTESIS

Existe interacción genotipo-ambiente para el carácter crecimiento entre dos cohortes de salmón del Atlántico (*Salmo salar*) cultivadas en agua dulce y en agua de mar.

OBJETIVOS

Objetivo General

Evaluar si existe interacción genotipo-ambiente para crecimiento corporal en dos cohortes de salmón del Atlántico (*Salmo salar*) criadas en agua dulce y en agua de mar.

Objetivos Específicos

1. Estimar la heredabilidad para el carácter crecimiento (peso a cosecha) en salmón del Atlántico (*S. salar*) cultivado en agua dulce.
2. Estimar la heredabilidad para el carácter crecimiento (peso a cosecha) en salmón del Atlántico (*S. salar*) cultivado en agua de mar.
3. Estimar la correlación genética entre el crecimiento agua dulce versus crecimiento en agua de mar en salmón del Atlántico (*S. salar*).

MATERIALES Y MÉTODOS

El presente estudio apunta a evaluar la interacción genotipo-ambiente para el carácter crecimiento en dos ambientes de cultivo diferentes y el nivel de re-clasificación de genotipos superiores entre ambos ambientes. Para el desarrollo del estudio se utilizó información correspondiente a un programa de mejoramiento genético de salmón del Atlántico, el cual pertenece a una compañía productora de salmones en Chile.

La información obtenida del programa corresponde a dos clases anuales independientes; clase 2012 y clase 2014. Los peces pertenecientes a las familias de ambas clases anuales fueron cultivados durante su etapa de engorda, desde “smolt” hasta tamaño de cosecha, en dos ambientes diferentes: agua dulce y agua de mar.

Programa de Familias

El programa se inició con la formación de familias de hermanos completos y medios hermanos, eligiendo reproductores que presentaban atributos fenotípicos deseables, correspondientes a tamaño (peso-longitud), factor de condición, estado sanitario y edad de madurez.

El procedimiento para generar las familias de hermanos completos y medios hermanos se realizó eligiendo 120 hembras y 60 machos, cruzados al azar a razón de 1 macho para dos o tres hembras durante un periodo de 4 semanas. Se tomaron 3.000 ovas de cada hembra para fertilizarlas e iniciar el proceso de incubación. Cada familia fue incubada individualmente en un sistema de balde con entrada y salida de agua independiente, a una temperatura de 8°C. Las ovas permanecieron en las incubadoras familiares hasta la etapa de ovas con ojo, momento en el que se realizó el “shocking”.

En el estado de ovas con ojo se separaron al azar 1.000 ovas por familia y se dispusieron en canastillos de incubación para cada familia hasta el estado de alevín de primera alimentación (770 unidades térmicas acumuladas).

Al momento de iniciar la primera alimentación, los alevines fueron dispuestos en estanques circulares de 0,11 metros cúbicos donde permanecieron hasta los 15 a 20 gramos, utilizándose para ello un estanque por familia. Una vez alcanzado este tamaño, los peces fueron marcados individualmente con un transponder (modelo ID100, Trovan), y se registró su peso y longitud. La lectura del transponder se realizó con un lector portátil (modelo GR-250, Trovan).

Los alevines marcados fueron tomados al azar para conformar el grupo denominado Núcleo y el grupo denominado Centinela. El grupo Núcleo corresponde a los peces que permanecieron durante todo el periodo de engorda en agua dulce. Para el grupo Núcleo, se marcaron 20 peces por familia de la clase 2012 y 60 peces por familia de la clase 2014. El grupo Centinela corresponde a los peces que fueron enviados a agua de mar para su etapa de engorda. Para el grupo Centinela, se marcaron 25 peces por familia de la clase 2012 y 40 peces por familia para la clase 2014 (Cuadro 1).

Cuadro 1. Número de peces marcados por grupo y clase anual

Clase Anual	Grupo	N° Peces marcados	N° Familias	N° Madres	N° Padres	N° Peces/Fam. Promedio
2012	Núcleo	2.307	123	123	70	19
	Centinela	3.131	123	123	70	25
	Total	5.438	123	123	70	
2014	Núcleo	4.549	75	75	44	60
	Centinela	2.982	75	75	44	40
	Total	7.531	75	75	44	

Una vez conformados los grupos Núcleo y Centinela, los peces que integraron el grupo Núcleo fueron ubicados en un estanque circular de 23 metros cúbicos hasta que alcanzaron el estado de “smolt”. A su vez, los peces del grupo Centinela fueron dispuestos en otro estanque de 23 m³ hasta que alcanzaron el estado de “smolt”.

Cuando los peces alcanzaron el estado de “smolt” se realizó un muestreo individual de peso y longitud. El grupo de peces perteneciente al Núcleo permaneció en una piscicultura de agua dulce hasta alcanzar su tamaño adulto, a una densidad final de 50 kg/m³ y el grupo Centinela fue trasladado a un centro de engorda en agua de mar, compartiendo una unidad de cultivo (balsa-jaula de 30 m * 30 m) con un grupo de peces de producción a una densidad final de 15 kg/m³, hasta alcanzar el tamaño de cosecha (5 kg. aproximadamente).

Los peces del grupo Centinela de las clases anuales 2012 y 2014 fueron criados en centros de producción de agua de mar ubicados en la Región de Aysén, Chile, específicamente en la zona de Melinka y canal Darwin, respectivamente. En ambas clases anuales la unidad de cultivo correspondió a una sola jaula. Los peces de los grupos Núcleo de las clases anuales 2012 y 2014 fueron engordados en pisciculturas ubicadas en el sector de Curarrehue, Región de la Araucanía y en el sector de Osorno, Región de Los Lagos, respectivamente. Para la clase anual 2012, los peces permanecieron en un estanque de cultivo durante todo este

periodo, inicialmente en un estanque de 23 metros cúbicos y posteriormente en un estanque de 80 metros cúbicos, la clase anual 2014 en cambio inició esta etapa en un estanque de 23 metros cúbicos y posteriormente fueron desdoblados al azar en cinco estanques de 23 metros cúbicos cada uno, hasta su evaluación final.

La evaluación de los peces en etapa adulto se realizó a través de muestreo de peso y longitud. El muestreo del grupo Centinela fue realizado en la planta de proceso una vez que los peces fueron cosechados al alcanzar un peso promedio aproximado de 5 kg. El muestreo del grupo Núcleo fue realizado en la piscicultura cuando los peces alcanzaron un peso promedio superior a los 5 kg (Figura 2).

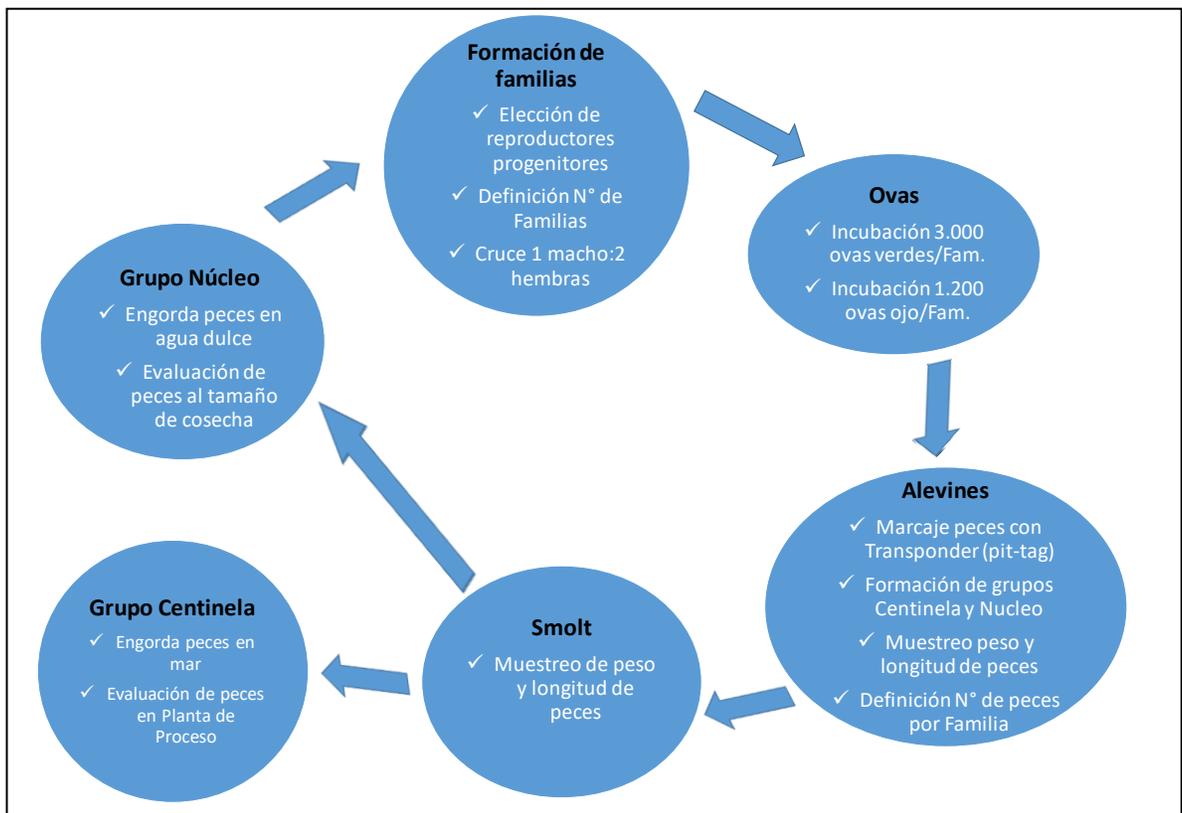


Figura 2. Esquema del programa de familias salmón del Atlántico (*S. salar*)

Medio ambiente

Los ambientes en que crecieron los peces de este estudio desde su estado de “smolt” hasta tamaño de cosecha, corresponden a ambiente de agua de mar y ambiente de agua dulce, ambos localizados en la zona geográfica del sur de Chile, pertenecientes a 3 regiones; Región de la Araucanía, Región de Los Lagos y Región de Aysén.

El ambiente de agua de mar corresponde a un sitio de engorda de salmones con una estructura de balsa-jaulas ubicadas en zonas de canales. Las condiciones ambientales de este cuerpo de agua corresponden principalmente a 32‰ de salinidad, fotoperiodo natural y temperatura que fluctúa entre 9,4 y 12,7°C como promedio de ambos centros, según la estación del año. Los niveles de oxígeno fluctuaron entre 5 y 8 mg/l en promedio de ambos centros. Las prácticas de cultivo se enmarcaron en estándares propios de producción intensiva.

El ambiente de agua dulce corresponde a dos pisciculturas de flujo abierto ubicadas en tierra, una de las cuales utiliza agua de vertiente con temperatura constante de 8°C durante todo el año, ubicada en el sector de Curarrehue, región de la Araucanía y otra que utiliza agua de río con temperatura fluctuante dependiente de la estación, la cual varía desde 7,8°C en invierno hasta 13°C en verano, ubicada en Osorno, región de Los Lagos. En ambas pisciculturas se utilizó fotoperiodo artificial controlado, control del oxígeno disuelto en las unidades de cultivo y densidades de cultivo similares en ambas piscicultura y acorde al tamaño de los peces.

Estructuración de la información

La información utilizada para el estudio se generó a partir de los siguientes hitos:

- **Formación de familias:** el número de la familia está definido por un valor correlativo para cada hembra en el proceso de desove. A su vez, este número representa el identificador de cada madre. Para el caso del padre, su identificación corresponde al número correlativo definido en el desove.
- **Muestreo de alevines:** corresponde al registro de peso en gramos y longitud en centímetros de cada pez al momento del marcaje.
- **Muestreo de “smolts”:** corresponde al registro de peso en gramos y longitud en centímetros de cada pez, llevado a cabo cuando los peces han alcanzado su etapa de esmoltificación.
- **Muestreo adulto:** corresponde al registro de peso en gramos y longitud en centímetros de cada pez cuando los peces han alcanzado el tamaño de cosecha.

Cada registro es individual para cada pez y se asocia a un identificador (ID) definido por la

marca (transponder), además permite asignar la información al grupo Núcleo o Centinela según corresponda.

Análisis estadístico

Estadística de resumen

Para las clases anuales 2012 y 2014 se realizó una estadística de resumen, donde se describen las variables peso (g) y edad (días) en individuos adultos para el grupo Núcleo y el grupo Centinela.

La estadística de resumen fue realizada a través del software InfoStat (Di Rienzo *et al.*, 2016).

Modelos

Para estimar los componentes de varianza y covarianza para peso adulto en agua de mar (PC) y peso adulto en agua dulce (PN) se utilizó un modelo animal lineal bivariado (Dufflocq *et al.*, 2017) definido como:

$$\begin{bmatrix} y_{PC} \\ y_{PN} \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} \mathbf{X}_{PC} & \mathbf{0} \\ \mathbf{0} & \mathbf{X}_{PN} \end{bmatrix} \begin{bmatrix} \mathbf{b}_{PC} \\ \mathbf{b}_{PN} \end{bmatrix} + \begin{bmatrix} \mathbf{Z}_{PC} & \mathbf{0} \\ \mathbf{0} & \mathbf{Z}_{PN} \end{bmatrix} \begin{bmatrix} \mathbf{u}_{PC} \\ \mathbf{u}_{PN} \end{bmatrix} + \begin{bmatrix} \mathbf{e}_{PC} \\ \mathbf{e}_{PN} \end{bmatrix}$$

Donde:

y_{PC} e y_{PN} corresponden a vectores para los registros fenotípicos para caracteres peso adulto en agua de mar y peso en agua dulce respectivamente.

\mathbf{b}_{PC} es el vector de los efectos fijos para peso adulto en mar; edad y jaula

\mathbf{b}_{PN} es el vector de los efectos fijos para peso adulto en agua dulce; edad y estanque

\mathbf{u}_{PC} y \mathbf{u}_{PN} vectores o efectos genéticos aleatorios del animal para peso adulto en agua de mar (PC) y peso adulto en agua dulce (PN), respectivamente.

\mathbf{e}_{PC} y \mathbf{e}_{PN} son vectores de los efectos residuales aleatorios para peso en agua de mar (PC) y peso en agua dulce (PN), respectivamente.

X_{PC} y Z_{PC} corresponden a matrices de diseño para peso en agua de mar

X_{PN} y Z_{PN} corresponden a matrices de diseño para peso en agua dulce

Para PC y PN los efectos aleatorios animales y residuales para el carácter peso se asume que:

$$\begin{aligned} u &= [u'_{PC} \ u'_{PN}]' \sim N(0, G0 \otimes A) \\ e &= [e'_{PC} \ e'_{PN}]' \sim N(0, R0 \otimes I_N) \end{aligned}$$

Donde A es la matriz de parentesco genético aditiva que incluye todos los animales en el pedigree, I_N es una matriz de identidad con dimensión N, \otimes corresponde al operador directo de producto. G0 y R0 son matrices de covarianza (2x2) de los efectos genético aditivo animal y residual, respectivamente.

Adicionalmente, el efecto de ambiente común para el rasgo crecimiento como peso adulto se probó a través de la prueba de cociente de verosimilitud LRT (Likelihood Ratio Test), en el grupo de peces criados en agua de mar y en el grupo de peces criados en agua dulce, contrastando en ambos casos el modelo univariado simple (sin incluir el efecto de ambiente común) versus el modelo univariado compuesto (incluyendo el efecto de ambiente común).

Los componentes de varianza y covarianza y los valores genéticos (EBVs) para peso adulto en agua de mar (PC) y peso adulto en agua dulce (PN) fueron estimados a través del método de máxima verosimilitud restringida (REML), utilizando el software ASREML (Gilmour *et al.*, 2009).

Estimación de heredabilidad

Según Falconer y Mackay (1996), la heredabilidad expresa la proporción de la varianza total debida a las diferencias en valor mejorante, que son las que determinan el parecido entre parientes. En el estudio de los caracteres métricos el aspecto más destacable de la heredabilidad es su función predictiva, ya que representa el grado en que el valor fenotípico proporciona una indicación fiable del valor mejorante.

Los valores fenotípicos individuales son los únicos que pueden evaluarse directamente, pero su influencia en la generación siguiente está determinada por el valor mejorante. La heredabilidad mide la correspondencia entre el valor fenotípico y valor mejorante, por lo tanto, se define como el coeficiente entre la varianza genética aditiva y la varianza fenotípica.

La heredabilidad para peso en agua de mar (PC) y peso en agua dulce (PN) fue calculada a través de la siguiente fórmula:

$$h_i^2 = \frac{\sigma_{Gi}^2}{\sigma_{Gi}^2 + \sigma_{Ei}^2}$$

Donde:

- i es el peso en agua de mar (PC) o en agua dulce (PN)
- σ_{Gi}^2 corresponde a las varianzas genéticas aditivas de la matriz G0
- σ_{Ei}^2 corresponde a la varianza residual desde la matriz R0.

Cálculo de correlación genética

Según Gjedrem (2005), una correlación fenotípica observada se puede deber al ambiente y/o a la covarianza genética. La covarianza entre dos caracteres puede ser estimada tanto a nivel fenotípico como genético, de manera similar a como se estima la varianza fenotípica o genética de un carácter.

Para estimar la correlación genética se combina la covarianza genética y las desviaciones estándar de los rasgos.

Las principales causas de correlación genética son la pleiotropía y el ligamiento. Un gen usualmente tiene su efecto principal sobre un carácter, pero con frecuencia los genes afectan a varios caracteres, y esta relación se llama pleiotropía. El efecto del gen también puede cambiar durante la vida, es decir, ser positivo en una etapa de la vida y negativo en otra. Cuando dos o más genes son localizados estrechamente en el cromosoma y ligados entre sí, pueden segregarse como una unidad y por lo tanto actúan como un gen en varias generaciones, causando también una correlación genética, la cual puede desaparecer con el tiempo producto de las recombinaciones.

Las correlaciones genéticas varían entre -1 y 1. La correlación genética igual o cercana a uno indica que los dos rasgos son genéticamente idénticos. La correlación genética entre dos rasgos genéticamente independientes es cero.

La correlación genética (r_{xy}) entre peso adulto Centinela (PC) y peso adulto Núcleo (PN) fue calculada a través de la siguiente fórmula (Falconer and Mackay, 1996):

$$r_{PC,PN} = \frac{\sigma_{aPC,aPN}}{\sqrt{\sigma_{aPC}^2 \sigma_{aPN}^2}}$$

Donde:

$\sigma_{aPC,aPN}$ es la covarianza genética aditiva entre peso adulto en agua de mar (PC) y peso adulto en agua dulce (PN).

σ_{aPC}^2 es la varianza genética aditiva de crecimiento en agua de mar (PC).

σ_{aPN}^2 es la varianza genética aditiva de crecimiento en agua dulce (PN).

RESULTADOS

Estadística descriptiva

El número total de peces evaluados fue de 2.474 en la clase anual 2012, pertenecientes a 102 familias y de 4.290 en la clase anual 2014, pertenecientes a 75 familias.

La clase anual 2012 presenta una media de peso adulto de 5.776 gramos para el grupo Núcleo y de 5.748 gramos para el grupo Centinela, mientras que para la clase anual 2014 el peso medio fue de 5.146 gramos en el grupo Núcleo y de 5.066 gramos en el grupo Centinela. La edad promedio de evaluación del peso adulto fue de 1.128 días y 1.488 días para Centinela y Núcleo respectivamente en la clase 2012, por su parte, para la clase 2014 la edad promedio de evaluación fue de 1.005 días para el grupo Centinela y de 1.085 días para el grupo Núcleo (Cuadro 2).

Cuadro 2. Estadística descriptiva de crecimiento en salmón del Atlántico (*S. salar*) por grupo y clase anual (Mín: Mínimo; Máx: Máximo; D.E.: Desviación estándar; CV: Coeficiente de variación)

Clase	Grupo	N° Peces	N° Familias	N° Madres	N° Padres	N° Peces por familia			Peso adulto (g)			Edad (días)			
						Media	Mín	Máx	Media	D.E.	CV	Mín	Máx	Media	D.E.
2012	Núcleo	943	102	102	65	9	5	16	5.776	1.350	23	1.600	10.000	1.488	19,1
	Centinela	1.531	102	102	65	15	5	22	5.748	1.779	31	966	10.210	1.128	19,8
	Total	2.474	102	102	65										
2014	Núcleo	2.832	75	75	44	38	18	85	5.146	1.148	22	2.000	9.300	1.085	4,9
	Centinela	1.458	75	75	44	19	9	42	5.066	961	19	1.800	8.400	1.005	4,7
	Total	4.290	75	75	44										

Prueba de cociente de verosimilitud (LRT)

En el Cuadro 3 se pueden observar los resultados del test de cociente de verosimilitud realizado en ambos grupos y clases anuales para análisis del efecto de ambiente común en las familias.

Cuadro 3. Resultados prueba de cociente de verosimilitud para efecto ambiente común (LRT) en peso adulto

	Grupo	Log L _c	Log L	V Cal.	χ^2 (g.l.=1)	P-value
2012	Núcleo ¹	-713,63	-713,98	0,70	3,84	0,40
	Centinela ²	-1579,72	-1580,32	1,20	3,84	0,27
2014	Núcleo ¹	-1414,12	-1415,60	2,96	3,84	0,09
	Centinela ²	-621,29	-623,32	4,06	3,84	0,04*

1: Peces criados en agua dulce, 2: Peces criados en agua de mar

* Indica significancia estadística del efecto ambiente común ($\alpha = 0,05$)

Para ambos grupos de la clase anual 2012, y para el grupo Núcleo de la clase anual 2014 no se detectó efecto de ambiente común significativo. Para el grupo Centinela de la clase anual 2014 se detectó efecto de ambiente común significativo. De acuerdo con estos resultados el efecto de ambiente común no ha sido incorporado en los modelos de análisis.

Hereditabilidad

La varianza genética aditiva (V_A) en la clase anual 2012 para el grupo Centinela fue mayor que para el grupo Núcleo, correspondientes a $1,19 \pm 0,22$ y $0,86 \pm 0,18$, respectivamente. Para la clase 2014 también el grupo Centinela presenta una mayor varianza genética aditiva (V_A) que el grupo Núcleo con $0,30 \pm 0,07$ y $0,25 \pm 0,05$ respectivamente. Las magnitudes del coeficiente de variación de la varianza genética aditiva en la clase 2012 para el Núcleo (16,05) y Centinela (18,97) fueron similares. Para la clase 2014 el CV_A para el Núcleo (9,72) y para Centinela (10,81) también fueron magnitudes similares (Cuadro 4).

Cuadro 4. Estimación de hereditabilidad (h^2), varianza fenotípica (V_P), varianza aditiva (V_A), coeficiente de variación de varianza aditiva (CV_A) y varianza residual (V_R) para el carácter peso a cosecha en salmón del Atlántico (*S. salar*) en dos clases anuales

Clase anual	Grupo	V_P	V_A	CV_A	V_R	h^2
2012	Núcleo ¹	$1,86 \pm 0,11$	$0,86 \pm 0,18$	16,05	$1,01 \pm 0,12$	$0,46 \pm 0,08$
	Centinela ²	$3,21 \pm 0,15$	$1,19 \pm 0,22$	18,97	$2,02 \pm 0,16$	$0,37 \pm 0,06$
2014	Núcleo ¹	$1,07 \pm 0,04$	$0,25 \pm 0,05$	9,72	$0,82 \pm 0,04$	$0,23 \pm 0,04$
	Centinela ²	$0,95 \pm 0,04$	$0,30 \pm 0,07$	10,81	$0,65 \pm 0,05$	$0,31 \pm 0,06$

1: Peces criados en agua dulce, 2: Peces criados en agua de mar

La heredabilidad estimada para la clase anual 2012 fue de $0,46 \pm 0,08$ en el grupo de peces criados en agua dulce (Núcleo), siendo este el mayor valor, mientras que para el grupo de peces criados en agua de mar (Centinela) fue de $0,37 \pm 0,06$. Por su parte, para la clase anual 2014 el valor estimado de heredabilidad para el grupo Núcleo fue de $0,23 \pm 0,04$ siendo el menor valor y para el grupo Centinela fue de $0,31 \pm 0,06$.

Correlación Genética

Las correlaciones genéticas estimadas a través del modelo bivariado mixto para el peso adulto entre los peces criados en agua dulce (PAN) y en agua de mar (PAC) fueron de $0,31 \pm 0,13$ y de $0,26 \pm 0,14$ para las clases anuales analizadas 2012 y 2014, respectivamente. Los valores de correlación estimados son significativos y bajos en ambas clases anuales, y presentan bajos errores estándar. Lo anterior sugiere una re-clasificación de acuerdo al mérito genético de las familias de peces evaluadas en agua dulce respecto a las criadas en agua de mar (Cuadro 5).

Cuadro 5. Estimación de correlación genética para peso adulto en salmón del Atlántico (S. salar) en dos clases anuales

Clase Anual	Variable	r_G	SE (r_G)
2012	PAN-PAC	0,31	0,13
2014	PAN-PAC	0,26	0,14

PAN: Peso adulto Núcleo, PAC: Peso adulto Centinela

DISCUSIÓN

En la selección artificial de peces resulta de particular interés la tasa de crecimiento. Los valores de heredabilidad para este rasgo son de considerable magnitud ($h^2 = 0,2-0,4$) en la mayoría de las especies y poblaciones de interés acuícola (Gjedrem, 2005).

Las heredabilidades estimadas en este estudio para el carácter crecimiento, en términos de peso adulto, son moderadas a alto ($0,23 \pm 0,04$ a $0,46 \pm 0,08$), valores que se encuentran dentro del rango reportado en bibliografía para salmón del Atlántico. Gjerde *et al.* (2005) estimaron heredabilidades para el peso corporal en salmón de Atlántico con valores correspondientes a $0,4 \pm 0,05$ (clase anual 1993) y $0,21 \pm 0,05$ (clase anual 1994). Otros estudios, en cambio, presentan valores muy inferiores, como es el caso de Quinton *et al.* (2005) quienes estimaron heredabilidades para peso a cosecha en salmón del Atlántico bajas a moderadas, desde 0,1 a 0,2, evaluadas en 4 clases anuales. Por otro lado, Powell *et al.* (2008) estimaron, también en salmón del Atlántico, heredabilidades moderadas a altas para peso al primer invierno, peso segundo invierno y peso de cosecha, con valores entre $0,43 \pm 0,04$ a $0,51 \pm 0,04$.

Si se consideran los valores de h^2 estimadas por grupo de análisis (Núcleo y Centinela), se puede apreciar que en el grupo Centinela se obtuvo heredabilidades relativamente similares en ambas clases anuales, $0,37 \pm 0,05$ en la clase anual 2012 y $0,31 \pm 0,06$ en la clase anual 2014. El grupo Núcleo presentó heredabilidades diferentes, observándose que para la clase anual 2012 este valor fue de $0,46 \pm 0,08$, la que corresponde al doble de la estimación para la clase 2014, la cual presentó un valor de $0,23 \pm 0,04$.

Winkelman y Peterson (1994), en un estudio realizado en salmón chinook (*Oncorhynchus tshawytscha*) estimaron valores de heredabilidad para el peso al primer invierno en cuatro cepas diferentes, en un rango de $0,28 \pm 0,07$ a $0,68 \pm 0,13$ mostrando que las magnitudes de estos valores de heredabilidad son tan amplios como los obtenidos en este estudio.

Domingos *et al.* (2013), estimaron valores de heredabilidad para el carácter peso de cosecha en barramundi (*Lates calcarifer*). Los valores encontrados fueron moderados, encontrándose dentro del rango $0,37 \pm 0,18$ y $0,42 \pm 0,11$ en experiencias de cultivo intensivo y semi-intensivo. Por otra parte, Dupont-Nivet *et al.* (2010) estimaron heredabilidades para el carácter peso alrededor de 400 gramos en promedio, en lubina (*Dicentrarchus labrax*), los valores encontrados fueron de $0,29 \pm 0,09$ a $0,45 \pm 0,12$ utilizando un modelo con efecto materno y de $0,48 \pm 0,08$ a $0,62 \pm 0,09$ sin incluir el efecto materno.

En un estudio realizado por Fishback *et al.* (2002) en trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*), se estimaron heredabilidades para crecimiento temprano y tardío en piscicultura. Estos fueron de moderados a altos, entre $0,546 \pm 0,034$ y $0,719 \pm 0,065$, mayores a los encontrados en el

presente estudio, sin embargo, los autores indican que estas heredabilidades estarían sobreestimadas debido a la incorporación de efectos genéticos no aditivos. Para la misma especie, Sea-Lim *et al.* (2013) obtuvieron heredabilidades bajas para peso a tamaño de cosecha en rango desde $0,18 \pm 0,09$ a $0,22 \pm 0,09$.

Los valores de heredabilidad estimados en este estudio para el crecimiento en peso, así como también los obtenidos por otros autores en diferentes especies de peces, en la mayoría de los casos son moderados. Según Winkelman y Peterson (1994) heredabilidades de estos rangos indican que al realizar selección daría lugar a un progreso genético sustancial para peso corporal. De esta forma esta ganancia se vería reflejada en las futuras generaciones cohortes estudiadas.

Existen escasos estudios relacionados a interacción genotipo-ambiente en salmón de Atlántico y ninguno que considere la evaluación del desempeño del rasgo peso adulto comparado en dos ambientes tan distintos como agua de mar y agua dulce.

De acuerdo al criterio establecido por Robertson (1959), no existe interacción genotipo-ambiente si la correlación genética es 1. Por el contrario, si la correlación genética es inferior a 0.8, y considerando un error estándar cercano a 0.2, como mínimo absoluto, existe evidencia de la presencia de interacción genotipo-ambiente. Los resultados obtenidos en el presente estudio indican la presencia de fuertes interacciones genotipo-ambiente para el peso corporal medido en ambos ambientes a edad de cosecha, con valores de correlación genética entre el peso adulto Núcleo y peso adulto Centinela de $0,31 \pm 0,13$ para la clase anual 2012 y de $0,26 \pm 0,14$ para la clase 2014. Las estimaciones de correlación de este estudio indican que existe un nivel elevado de interacción genotipo-ambiente para el carácter de peso corporal de peces criados en agua de mar y en agua dulce. Según Falconer y Mackay (1996), si la correlación genética es alta, entonces el desempeño en dos ambientes diferentes representa casi el mismo carácter, controlado por el mismo conjunto de genes, si es baja, entonces los caracteres son en gran medida diferentes, y un alto desempeño requiere un set de genes diferente. De igual forma Sae-Lim *et al.* (2013) mencionan que correlaciones bajas indican una fuerte interacción genotipo-ambiente al evaluar diferentes grupos de truchas en diferentes ambientes para el carácter crecimiento (peso a cosecha), obteniendo resultados de correlación en rangos desde $0,19 \pm 0,13$ a $0,48 \pm 0,12$.

Un estudio de interacción genotipo-ambiente realizado por Dupont-Nivet *et al.* (2010) en lubina para el carácter crecimiento, obtuvo como resultado de correlación genética entre diferentes granjas localizadas en 4 diferentes países, valores en un rango de $0,75 \pm 0,09$ a $0,93 \pm 0,04$, indicando ausencia de interacción genotipo-ambiente. Domingos *et al.* (2013) estudiaron interacción genotipo ambiente en barramundi para caracteres de crecimiento a través de estimaciones de correlación genética en peces criados en jaulas con agua dulce y agua de mar, después de 62 días post eclosión ($r > 0,97$) y correlación genética para peces criados hasta tamaño de cosecha en agua dulce, en un sistema de recirculación intensivo versus un estanque semi-intensivo ($r \sim 0,99$). Los valores de correlación indicaron la ausencia de interacción genotipo-ambiente. Por otra parte, un estudio de interacción genotipo-

ambiente realizado por Banger *et al.* (2015) en bacalao del Atlántico (*Gadus morhua* L.) para crecimiento en 4 granjas en Noruega, con dos clases anuales, encontraron estimaciones altas de correlación genética entre un grupo Núcleo y diferentes granjas de cultivo. Los valores varían en rangos de $0,81 \pm 0,19$ a $0,96 \pm 0,17$ sugiriendo baja re-clasificación de genotipos.

Según Sae-Lim *et al.* (2016), quienes realizaron una revisión de 38 especies acuícolas, los estudios de interacción genotipo-ambiente son escasos para muchos de los caracteres económicamente importantes. Además, indicaron que la re-clasificación es moderada para el crecimiento ($r_G=0.72$) y sobrevivencia ($r_G=0.54$) y que la re-clasificación significativa es motivo de preocupación porque la selección en un núcleo conduce a respuestas genéticas menores en entornos comerciales en comparación con el caso en que no existe una nueva clasificación. Por otra parte, señalan que la re-clasificación es débil para la edad de madurez sexual y la apariencia del pez ($r_G=0,86$), implicando que el mejoramiento genético en un ambiente se espera sea efectivo en los otros ambientes.

Los resultados de correlación genética estimadas en este estudio indican que existe una considerable reclasificación de los grupos de genotipos (familias) medidos en dos ambientes. Es decir, el orden en el ranking del mérito genético de las mejores familias en agua de mar es diferente al de agua dulce para el carácter peso corporal.

Desde el punto de vista práctico, la existencia de interacción genotipo-ambiente en salmón del Atlántico indica que el ranking de los genotipos es diferente en ambos ambientes, por lo tanto, en los programas de mejoramiento genético para el carácter crecimiento se debieran incorporar herramientas que incluyan la información del desempeño de los peces en agua de mar para la selección de los reproductores en agua dulce, como por ejemplo, la incorporación de peces centinelas para la obtención de fenotipos de crecimiento en agua de mar o incluso información molecular para incrementar la eficiencia de la selección de acuerdo al método denominado selección genómica.

CONCLUSIONES

Las heredabilidades obtenidas en este estudio para el carácter crecimiento fueron moderadas a altas en las dos poblaciones evaluadas en ambos ambientes de cultivo, agua de mar y agua dulce. Estas estimaciones constituyen magnitudes interesantes que indican que es factible mejorar el carácter crecimiento a través de selección genética.

Las correlaciones genéticas entre los grupos de peces criados en agua dulce y agua de mar para el carácter crecimiento fueron bajas, mostrando que existe una considerable interacción genotipo-ambiente. Por ello, se debe tener precaución al mejorar el carácter crecimiento utilizando información de agua dulce cuando el objetivo es producir en agua de mar, debido a que el ranking del mérito genético de los reproductores va a sufrir una re-clasificación.

LITERATURA CITADA

Bangera, R., T. Drangsholt, H.M. Nielsen, P. Sae-Lim, J. Odegard, V. Puvanendram, O. Hansen and A. Mortensen. 2015. Genotype by environment interaction for growth in Atlantic cod (*Gadus morhua* L.) in four farms of Norway. *Journal of marine science and engineering*, 3: 412-427.

Di Rienzo J.A., F. Casanoves, M.G. Balzarini, L. González, M. Tablada and C.W. Robledo. InfoStat versión 2016. Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. URL <http://www.infostat.com.ar>

Domingos, J.A., C. Smith-Keune, N. Robinson, S. Loughnan, P. Harrison and D.R. Jerry. 2013. Heritability of harvest growth traits and genotype-environment interactions in barramundi, *Lates calcarifer* (Bloch), 2013. *Aquaculture*, 402-403: 66-75.

Dufflocq, P., Lhorente, J.P., Bangera, R., Neira, R., Newman, S. and Yañez, J.M. 2017. Correlated response of flesh color to selection for harvest weight in coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*). *Aquaculture*, 472: 38-43.

Dupont-Nivet, M., B. Karahan-Nomm, A. Vergnet, O. Merdy, P. Haffray, H. Chavanne, B. Chatain and M. Vandeputte. 2010. Genotype by environment interactions for growth in European seabass (*Dicentrarchus labrax*) are large when growth rate rather than weight is considered. *Aquaculture*, 306: 365-368.

Falconer, D. S. and T.F.C. Mackay. 1996. *Introduction to Quantitative Genetics*. 4th ed. Logman Group Limited, Harlow, Essex, U.K.

Falconer, D. S. and T.F.C. Mackay 2001. *Introducción a la genética cuantitativa*. Saragozza-España. 469 p.

FAO. 2016. *Sistema de Información sobre Alimentos y Recursos Fertilizantes para la Acuicultura*. (Disponible en www.fao.org)

Fishback, A., R. Danzmann, M. Ferguson and J. Gibson. 2002. Estimates of genetic parameters and genotype by environment interactions for growth traits of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) as inferred using molecular pedigrees. *Aquaculture*, 206: 137-150.

Gilmour, A., Gogel, B., Cullis, B., Thompson, R., Butler, D., Cherry, M., Collins, D., Dutkowski, G., Harding, S. and Haskard, K. 2009. ASReml User Guide Release 3.0. VSN International Ltd., UK 275 (<http://www.vsnl.co.uk>)

Gjerde, B., Ma. J. Pante and G. Baeverfjord. 2005. Genetic variation for a vertebral deformity in Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Aquaculture*, 244: 77-87.

Gjedrem, T. 2005. Selection and breeding Programs in Aquaculture. AKVAFORSK, Institute of Aquaculture Research AS, Norway.

Gjedrem, T. 2012. Genetic improvement for the development of efficient global aquaculture: a personal opinion review. *Aquaculture* 344-349, 12-22.

Powell, J., I. White, D. Guy and S. Brotherstone. 2008. Genetic parameters of production traits in Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Aquaculture*, 274: 225-231.

Quinton, C., I. McMillan and B. Glebe. 2005. Development of an Atlantic salmon (*Salmo salar*) genetic improvement program: genetic parameters of harvest body weight and carcass quality traits estimated with animal models. *Aquaculture*, 247: 211-217.

Robertson, A. 1959. The sampling variance of the genetic correlation coefficient. *Biometrics* 15: 469-485.

Sae-Lim, P., A. Kause, H.A. Mulder, K.E. Martin, A.J. Barfoot, J.E. Parsons, J. Davidson, C.E. Rexroad III, Van J.A.M. Arendonk and H. Komen. 2013. Genotype-by-environment interaction of growth traits in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): A continental scale study. *J. Anim. Sci.* 91: 5572-5581.

Sae-Lim, P., P. Gjerde, H.M. Nielsen, H. Mulder and A. Kause. 2016. A review of genotype-by-environment interaction and micro-environmental sensitivity in aquaculture species. *Reviews in Aquaculture* 8: 369-393.

Sernapesca. 2016. Anuario Estadístico Sernapesca (Disponible en <http://www.sernapesca.cl/>)

Winkelman, A.M. and R.G. Peterson. 1994. Heritabilities, dominance variation, common environmental effects and genotype by environment interactions for weight and length in chinook salmon. *Aquaculture*, 125: 17-30.