



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
Centro Interdisciplinario de Ciencias Marinas



EFFECTO DE DIFERENTES NIVELES DE ÁCIDO
ARAQUIDÓNICO EN EL ALIMENTO DE
REPRODUCTORES DE CABRILLA ARENERA
Paralabrax maculatofasciatus SOBRE LA
CALIDAD DE EMBRIONES Y LARVAS

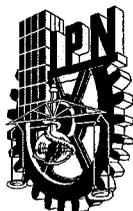
TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS
EN
MANEJO DE RECURSOS MARINOS

PRESENTA

MARIANA RODRÍGUEZ TREJO

LA PAZ, B.C.S., OCTUBRE DE 2008



INSTITUTO POLITECNICO NACIONAL

SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

ACTA DE REVISION DE TESIS

En la Ciudad de La Paz, B.C.S., siendo las 12:00 horas del día 16 del mes de Octubre del 2008 se reunieron los miembros de la Comisión Revisora de Tesis designada por el Colegio de Profesores de Estudios de Posgrado e Investigación de CICIMAR para examinar la tesis de grado titulada:

**"EFECTO DE DIFERENTES NIVELES DE ÁCIDO ARAQUIDÓNICO EN EL ALIMENTO
DE REPRODUCTORES DE CABRILLA ARENERA *Paralabrax maculatofasciatus*
SOBRE LA CALIDAD DE EMBRIONES Y LARVAS"**

Presentada por el alumno:

RODRÍGUEZ
Apellido paterno

TREJO
materno

MARIANA
nombre(s)

Con registro:

A	0	5	0	1	1	7
---	---	---	---	---	---	---

Aspirante al grado de:

MAESTRÍA EN CIENCIAS EN MANEJO DE RECURSOS MARINOS

Después de intercambiar opiniones los miembros de la Comisión manifestaron **SU APROBACION DE LA TESIS**, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.

LA COMISION REVISORA

Director de tesis
PRIMER VOCAL

MC. JOSÉ LUIS ORTIZ GALINDO

PRESIDENTE

DRA. LAURA SÁNCHEZ VELASCO

SECRETARIO

MC. YOLOXOCHITL E. RODRÍGUEZ MONTESINOS

SEGUNDO VOCAL

DR. ROBERTO CIVERA CERECEDO
2°. DIRECTOR

TERCER VOCAL

DR. MARCIAL ARELLANO MARTÍNEZ

EL PRESIDENTE DEL COLEGIO

DR. RAFAEL CERVANTES DUARTE



IPN
CICIMAR
DIRECCION



INSTITUTO POLITECNICO NACIONAL SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

CARTA CESIÓN DE DERECHOS

En la Ciudad de La Paz, B.C.S., el día 24 del mes Octubre del año 2008, el (la) que suscribe MARIANA RODRÍGUEZ TREJO alumno(a) del Programa de MAESTRÍA EN CIENCIAS EN MANEJO DE RECURSOS MARINOS con número de registro A050117 adscrito al CENTRO INTERDISCIPLINARIO DE CIENCIAS MARINAS manifiesta que es autor (a) intelectual del presente trabajo de tesis, bajo la dirección de: MC. JOSÉ LUIS ORTIZ GALINDO y cede los derechos del trabajo titulado: "EFECTO DE DIFERENTES NIVELES DE ÁCIDO ARAQUIDÓNICO EN EL ALIMENTO DE REPRODUCTORES DE CABRILLA ARENERA *Palabrax maculatofasciatus* SOBRE LA CALIDAD DE EMBRIONES Y LARVAS" al Instituto Politécnico Nacional, para su difusión con fines académicos y de investigación.

Los usuarios de la información no deben reproducir el contenido textual, gráficas o datos del trabajo sin el permiso expreso del autor y/o director del trabajo. Este puede ser obtenido escribiendo a la siguiente dirección: paralabrax@hotmail.com jortiz@ipn.mx

Si el permiso se otorga, el usuario deberá dar el agradecimiento correspondiente y citar la fuente del mismo.

B.M. MARIANA RODRÍGUEZ TREJO

nombre y firma

*A mis padres Manuel y Aracelí
A mi hermana Andrea...*

Agradecimientos

Al Centro Interdisciplinario de Ciencias Marinas (CICIMAR-IPN), por haberme permitido realizar mis estudios de maestría en esta institución, así como todas las facilidades otorgadas para la realización del presente trabajo.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) y al Programa Institucional de Formación de investigadores (PIFI), por el apoyo económico proporcionado.

A mi director de tesis, M.en C. José Luis Ortiz Galindo, por haber aceptado la dirección de esta tesis, por sus observaciones y comentarios que permitieron concretar este trabajo y por estar abierto a aceptar nuestras propuestas. Así como el apoyo con el material, reactivos e instalaciones que fueron requeridos.

A mi codirector de tesis, Dr. Roberto Civera Cerecedo, por haber aceptado la dirección de esta tesis, por sus observaciones y sugerencias que ayudaron a complementar este trabajo. Así como las facilidades proporcionadas para trabajar en las instalaciones, los ingredientes para la realización de los alimentos y los análisis químicos realizados.

A mi comité revisor, Dra. Laura Sánchez Velasco, Dr. Marcial Arellano Martínez, M. en C. Yoloxochitl Elizabeth Rodríguez Montesinos y Dr. José de la Cruz Agüero, por aceptar la revisión de la tesis, por sus correcciones y comentarios que contribuyeron a darle mas claridad al trabajo.

Al M. en C. Martín Oscar Rosales Velásquez, por instruirme en el mantenimiento de los peces y en el manejo del sistema de reproductores. Así como su ayuda en la captura y obtención de alimento fresco.

Al M. en C. Víctor Carrasco Chávez y Biol. Mar. Sandra Luz Enciso Lizarraga, por su ayuda en la determinación y control de los parámetros de calidad del agua.

Al M. en C. Ernesto Goytortúa Bores, por su ayuda en la formulación y elaboración de los alimentos.

A la M. en C. Laura Carreón Palau, por su ayuda y facilidades otorgadas para realizar los análisis de ácidos grasos.

A mis amigos, Carolina, Rebeca, Shelley, Nicolás, Damaris, Mariana, Luís, Gil, Azucena, Natalia, Avryl, Adriana, Abigail, Rubén, Roman, Martín Oscar, Víctor, Tanos, a quienes les agradezco su apoyo y buenos deseos, por hacer el trabajo pesado mas ameno y por compartir anécdotas y buenas experiencias.

A Juan Manuel, a quien le agradezco su apoyo de principio a fin, por haber tenido confianza en mi para darle continuidad a las ideas surgidas de su trabajo, por su paciencia, consejos y motivación que no solo han contribuido en mi formación académica, sino también en mi crecimiento como persona, por darle claridad a las cosas en los momentos difíciles y por las buenas experiencias compartidas durante todo este tiempo.

A mi familia, por la confianza que depositan en mi, por su paciencia y motivación, por haber cuidado que no me halla hecho falta nada y por el esfuerzo que han hecho para seguirme dando apoyo económico, sin el cual no hubiera podido seguir dedicada a concluir este trabajo.

Índice

Glosario	i
Listado de Tablas	iii
Listado de Figuras	iv
Resumen	v
Abstract	vi
1. Introducción	1
2. Antecedentes	5
2.1. Aspectos biológicos de la especie de estudio	5
2.1.1. Distribución geográfica	5
2.1.2. Reproducción	5
2.1.3. Hábitos alimentarios	5
2.2. Aspectos sobre los ácidos grasos en peces	6
2.2.1. Requerimientos de ácidos grasos esenciales en peces	6
2.2.2. Funciones de los AGAI en los vertebrados	8
2.2.3. Importancia del estudio de lípidos y ácidos grasos	9
2.3. Estudios sobre nutrición de reproductores	10
2.3.1. Estudios sobre requerimientos de ácidos grasos esenciales	10
2.3.2. Estudios sobre requerimientos de ácido araquidónico (ArA) de los reproductores	12
2.3.3. Estudios sobre nutrición de reproductores de <i>Paralabrax maculatofasciatus</i>	14
3. Justificación	17
4. Hipótesis	18
5. Objetivos	19
5.1. Objetivo general	19
5.2. Objetivos particulares	19
6. Materiales y métodos	20
6.1. Descripción del Sistema Cerrado de Inducción al Desove	20
6.2. Animales experimentales	23
6.2.1. Captura	23
6.2.2. Tratamiento profiláctico	23
6.2.3. Cuarentena	24

6.2.4. Determinación del sexo y distribución de reproductores en los tanques	24
6.3. Alimentos	24
6.3.1. Alimento fresco	24
6.3.2. Alimentos experimentales	25
6.3.2.1. Formulación	25
6.3.2.2. Elaboración	26
6.3.2.3. Empaquetado y almacenado	27
6.4. Diseño experimental	28
6.4.1. Condiciones experimentales y mantenimiento de reproductores	29
6.5. Criterios de calidad	29
6.5.1. Parámetros reproductivos	29
6.5.1.1. Fecundidad parcial	29
6.5.1.2. Viabilidad	30
6.5.2. Parámetros morfológicos	30
6.5.2.1. Morfología de los blastómeros	30
6.5.3. Índices zootécnicos	31
6.5.3.1. Tasas de eclosión, sobrevivencia larvaria y sobrevivencia a la inanición	31
6.5.3.2. Sobrevivencia al estrés hiperosmótico agudo	32
6.5.4. Composición de ácidos grasos de los embriones	34
6.6. Técnicas analíticas	34
6.6.1. Calidad del agua	34
6.6.2. Análisis químico de la composición	35
6.6.3. Análisis de ácidos grasos	35
6.6.3.1. Extracción de lípidos totales	35
6.6.3.2. Extracción de ácidos grasos totales	36
6.6.3.2.1. Metanolisis ácida	36
6.6.3.2.2. Trans esterificación directa (TED)	37
6.6.3.4. Identificación y cuantificación de ácidos grasos	38
6.7. Análisis estadístico	39

7. Resultados	40
7.1. Condiciones experimentales	40
7.1.1. Calidad del agua del Sistema Cerrado de Inducción al Desove	40
7.1.2. Biometría de reproductores	40
7.1.3. Alimentos	41
7.1.3.1. Composición química de los alimentos experimentales y del alimento fresco	41
7.1.3.2. Composición de ácidos grasos de los alimentos experimentales y del alimento fresco	43
7.2. Criterios de calidad	46
7.2.1. Parámetros reproductivos	46
7.2.1.1. Fecundidad	46
7.2.1.2. Viabilidad	46
7.2.2. Parámetros morfológicos	47
7.2.2.1. Morfología de los blastómeros	47
7.2.3. Índices zootécnicos	48
7.2.3.1. Tasa de eclosión	48
7.2.3.2. Supervivencia larvaria	48
7.2.3.3. Supervivencia larvaria al estrés hiperosmótico agudo	48
7.2.3.4. Supervivencia larvaria a la inanición	48
7.2.4. Composición de ácidos grasos de los embriones	49
8. Discusión	53
8.1. Validez de resultados	53
8.2. Efecto del nivel de ArA de los alimentos experimentales y fresco sobre la fecundidad de los reproductores	54
8.3. Efecto del nivel de ArA de los alimentos experimentales y fresco sobre la composición de los embriones	56
8.4. Efecto del contenido de ArA de los embriones sobre la morfología de los blastómeros y la viabilidad de los embriones	58
8.5. Efecto del contenido de ArA de los embriones sobre la tasa de eclosión, supervivencia larvaria, supervivencia larvaria al estrés hiperosmótico agudo y supervivencia larvaria a la inanición	62

9. Conclusiones	66
10. Recomendaciones	67
11. Bibliografía	68

Glosario

Ácidos grasos (AG): son cadenas largas de carbonos unidas a un grupo carboxilo terminal; la cadena hidrocarbonada puede ser saturada (sin dobles enlaces) o insaturada (con uno o mas dobles enlaces), aunque también existen unos cuantos ácidos grasos con enlaces triples (Lehninger, 1982; Gurr y Harwood, 1991).

Ácidos grasos esenciales (AGE): ácidos grasos poliinsaturados (series n-3 y n-6) que no pueden ser sintetizados o solo en pequeñas cantidades insuficientes, por lo que deben ser obtenidos del alimento y que son necesarios para la vida de los animales. En vertebrados se consideran como esenciales el 18:2 (n-6), 18:3 (n-3), 20:4 (n-6), 20:5 (n-3) y 22:6 (n-3) (Gunstone y Herslöf, 2000).

Blastómero: grupo de células formadas a través de la mitosis durante la segmentación, colectivamente forman la blástula y rodean el blastocele (Schoenwolf, 2001).

Eclosión: Proceso en el cual el embrión emerge de las envolturas del huevo (Balon, 1981).

Embrión: Primer periodo de la ontogenia que inicia con la activación del huevo y finaliza con la alimentación exógena y se caracteriza por nutrición exclusivamente derivada del aporte materno (Balon, 2002)

Epibolia: tipo de gastrulación, característica de la segmentación meroblástica, que comprende la formación del anillo germinal y el escudo embrionario durante el envolvimiento del vitelo por el ectodermo (Schoenwolf, 2001).

Estrés osmótico: Proceso de desequilibrio iónico de un organismo causado al ser sometido a una variación hiper o hiposmótico del ambiente externo con respecto a su ambiente interno.

Fecundidad parcial: Numero de óvulos liberados por desove

Larva: Periodo de la ontogenia indirecta que inicia con el comienzo de la alimentación exógena y finaliza con la metamorfosis a juvenil (Balon, 2002).

Lípido: Grupo heterogéneo de sustancias que tienen en común la propiedad de insolubilidad en el agua, pero que si tienen solubilidad en solventes no polares como el cloroformo, hidrocarburos o alcoholes (Lenninger, 1982).

Saco vitelino: membrana extraembrionaria que rodea al vitelo, formada por la esplacnopleura (Schoenwolf, 2001).

Segmentación: serie de rápidas divisiones mitóticas que dan como resultado la blastulación, la segmentación inicia después de la fecundación y produce la formación de los blastómeros (Schoenwolf, 2001).

Viabilidad: Porcentaje de huevos con potencial de desarrollo, con respecto al lote de huevos totales obtenidos en un desove.

Vitelo: reserva de material nutritivo compuesto principalmente por lípidos y proteínas, almacenados en el huevo (Eichler, 1978).

Listado de Tablas

Tabla 1. Principales funciones de los ácidos grasos altamente insaturados (ArA, EPA y DHA) en los vertebrados.....	8
Tabla 2. Fórmulas de los alimentos experimentales utilizados con reproductores de <i>Paralabrax maculatofasciatus</i>	26
Tabla 3. Diseño experimental para determinar el efecto del nivel de ácido araquidónico en el alimento de reproductores de <i>Paralabrax maculatofasciatus</i> , sobre la calidad de embriones y larvas.....	28
Tabla 4. Parámetros de calidad del agua del Sistema Cerrado de Inducción al Desove durante el periodo experimental.....	40
Tabla 5. Longitud patrón (cm) y peso (g) de reproductores de <i>Paralabrax maculatofasciatus</i> al inicio y al final del periodo experimental.....	41
Tabla 6. Composición química (%) de los alimentos experimentales y del alimento fresco, utilizados para alimentar a reproductores de <i>Paralabrax maculatofasciatus</i>	42
Tabla 7. Composición de ácidos grasos (% de materia seca) de los alimentos experimentales y fresco utilizados para alimentar a peces reproductores de <i>P. maculatofasciatus</i>	45
Tabla 8. Fecundidad parcial (número de huevos) y viabilidad (% de embriones vivos en fase de embrión) obtenidas de reproductores de <i>Paralabrax maculatofasciatus</i> alimentados con los alimentos experimentales y el alimento fresco.....	46
Tabla 9. Índices zootécnicos de embriones y larvas de <i>Paralabrax maculatofasciatus</i> , obtenidos de reproductores alimentados con los alimentos experimentales y el alimento fresco.....	49
Tabla 10. Composición de ácidos grasos de embriones (µg/embrión en base seca) obtenidos de reproductores de <i>Paralabrax maculatofasciatus</i> alimentados con alimentos experimentales y alimento fresco.....	52

Listado de Figuras

Figura 1. Rutas de biosíntesis de los ácidos grasos altamente insaturados (AGAI) de C ₂₀ y C ₂₂ a partir de los precursores n-3, n-6 y n-9.....	7
Figura 2. Esquema del Sistema Cerrado de Inducción al Desove utilizado para experimentación con reproductores de <i>Paralabrax maculatofasciatus</i>	22
Figura 3. Esquema de la incubadora utilizada para la evaluación de la calidad de embriones y larvas de <i>Paralabrax maculatofasciatus</i> , obtenidas de reproductores alimentados con los alimentos experimentales y el alimento fresco.....	33
Figura 4. Valor de forma de los blastómeros de embriones en fase de segmentación obtenidos de reproductores de <i>Paralabrax maculatofasciatus</i> alimentados con los alimentos experimentales y el alimento fresco.....	47

Resumen

En el presente trabajo se estudió el efecto del nivel del ácido araquidónico (ArA) en el alimento de reproductores de *Paralabrax maculatofasciatus* sobre el desempeño reproductivo y la calidad de embriones y larvas. Para realizarlo, se probaron cuatro alimentos experimentales comprimidos secos, con 0.17 (1), 0.39 (2), 0.68 (3) y 0.26% (4) de ArA (en base seca) y un alimento control que consistió en juveniles de mojarra *Eucinostomus* spp. frescos congelados, con 0.26% de ArA. Los criterios de calidad utilizados para evaluar el efecto de los tratamientos alimentarios fueron la fecundidad y la viabilidad, como parámetros reproductivos, la morfología de los blastómeros, tasa de eclosión y composición de ácidos grasos, como parámetros de calidad de embriones y la sobrevivencia larvaria, sobrevivencia al estrés hiperosmótico agudo y sobrevivencia a la inanición, como parámetros de calidad de larvas. Los resultados mostraron que la composición de ArA y ácido eicosapentaenoico (EPA) de los alimentos experimentales tuvo efecto sobre la composición de los embriones, ya que se observó un incremento proporcional de estos ácidos grasos en los embriones conforme incremento su nivel en el alimento. No obstante, el contenido de ácido docosahexaénoico (DHA) fue similar entre los embriones obtenidos con los diferentes alimentos. Los resultados de las pruebas de calidad, mostraron que el nivel de 0.2% de ArA con una relación de ArA/EPA de 0.2 contenidos en el 1, fue suficiente para obtener una morfología de los blastómeros, tasa de eclosión, sobrevivencia larvaria, sobrevivencia larvaria al estrés hiperosmótico agudo a la inanición, similares a los valores obtenidos de los embriones de reproductores alimentados con mojarra y mayores en comparación a los resultados obtenidos con alimentos experimentales probados en trabajos anteriores. Sin embargo, la viabilidad promedio (% de embriones vivos) de los embriones obtenidos de reproductores alimentados con mojarra (78%) fue significativamente mayor que el de los obtenidos con los alimentos experimentales. Ya que los embriones obtenidos con los alimentos experimentales presentaron una alta mortalidad durante el proceso de epibolia (gastrulación), durante el cual se presenta una alta actividad metabólica que genera una gran producción de radicales libres, esto sugiere la hipótesis de que en los alimentos falta incluir o complementar con antioxidantes (vitamina E, C y astaxantinas), para proteger a los ácidos grasos del vitelo y de las membranas del embrión, de su oxidación por el proceso de estrés oxidativo.

Abstract

Present work was to study the effect of the dietary level of arachidonic acid (ArA) in the feeds of broodstock of *Paralabrax maculatofasciatus* on the reproductive performance and the quality of embryos and larvae. Four experimental practical diets, containing 0.17 (1), 0.39 (2), 0.68 (3), and 0.26% (4) ArA (in dry base) and a control diet of frozen juvenile mojarra *Eucinostomus* spp. containing 0.26% ArA were tested. The quality criteria used to evaluate the effect of the dietary treatments were the fecundity and the viability, as reproductive parameters, the morphology of the blastomere, rate of hatching, and composition of fatty acids, as parameters of embryo quality, and the larvae survival, osmotic stress survival, and starvation survival as parameters of larval quality. The results showed that the composition of ArA and eicosapentaenoic acid (EPA) of the experimental diets had an effect on their content in the embryos, because a gradual increase of both fatty acid was measured in the embryos, as its level in the feed increased. The content of docosahexaenoic acid (DHA) was similar among the embryos obtained with the different treatments. The results of the quality criteria test showed, that the dietary level of 0.2% of ArA and the proportion ArA/EPA of 0.2 contained in the diet 1, it was enough to obtain morphology of the blastomere, rate of hatching, larvae survival, osmotic stress survival, and starvation survival, similar to those obtained with the fresh food. However, the average viability of the embryos (% live embryos) obtained with fresh food (78%), was significant high that the obtained with the practical diets. This results suggest, that small quantities of ArA like the contained in the diet 1, they allow to increase the fecundity and obtain a better embryo and larvae quality than obtained with other practical diets tested before. However the viability of the embryos obtained with the practical diets was less than obtained with fresh feed. Because the embryos obtained with practical diets die during the epiboly process (gastrulation), this suggest the hypothesis, that the practical diets tested in this work, they lack of antioxidants (E, C vitamins and astaxantines) to protect the fatty acid of the yolk and embryo cell layers, from the oxidation produced for the oxidative stress process that occurs in a high rate in this development period due to the high metabolic activity generates a high production of free radicals

1. Introducción

En sus inicios, el cultivo de peces marinos se sustentó exclusivamente en la captura de juveniles silvestres y su engorda en sistemas de cultivo extensivo, en estanques supramareales en Asia o en encierros en lagunas costeras en los países del Mediterráneo (Shepherd, 1988; Moretti *et al.*, 1999). Sin embargo, el crecimiento de esta actividad productiva se vió afectada por la indisponibilidad de juveniles, causada por la amplia variación en el tamaño de las poblaciones naturales, derivada de la sobrepesca, el cambio de las condiciones ambientales costeras y la contaminación (Moretti *et al.*, 1999).

Debido a que este problema afectó la proyección de los ciclos de cultivo a lo largo del año y limitó la productividad de los sistemas de cultivo comerciales, a partir de 1887, en Japón se realizaron los primeros esfuerzos dirigidos a desarrollar métodos confiables para la producción masiva de juveniles de especies de importancia comercial en ese país, tales como *Pagrus major* (Fushimi, 2001). Inicialmente los estudios se fundamentaron en aspectos de manejo e inducción al desove de reproductores en cautiverio (Watanabe y Vassallo-Agius, 2003) y en estudios sobre condiciones de cultivo, manejo, nutrición y alimentación de larvas, esto último sustentado en la producción masiva del rotífero *Brachionus plicatilis* y su utilización como alimento para las larvas (Watanabe *et al.*, 1983; Fulks y Main, 1991; Hagiwara *et al.*, 2001). Estos estudios permitieron establecer a finales de 1970, protocolos para la obtención de huevos a lo largo del año mediante la reproducción controlada y protocolos confiables para la cría de larvas y juveniles, con lo cual se evitó la dependencia de juveniles capturados del medio natural.

Los métodos desarrollados para el cultivo de *Pagrus major* en Japón fueron adoptados y modificados en el resto del mundo para el cultivo en sistemas semi-intensivos e intensivos de las especies que en la actualidad tienen gran importancia comercial (Moretti *et al.*, 1999; Lee y Ostrowski, 2001; Shields, 2001; Brown *et al.*, 2003; Hong y Zhang, 2003; Marte, 2003).

No obstante, a pesar del desarrollo de las técnicas para el cultivo masivo de larvas, el crecimiento de esta actividad se vió nuevamente limitado por la alta mortalidad de embriones y larvas al inicio de su desarrollo, atribuidas a una mala condición nutricional de los reproductores en cautiverio, por lo que se realizaron investigaciones enfocadas a establecer sus requerimientos nutricionales de vitaminas, minerales, pigmentos, proteínas y lípidos (en particular, los ácidos grasos esenciales de cadena larga: ácido docosahexaénoico DHA, ácido eicosapentaenoico EPA y ácido araquidónico ArA), con lo cual se pretendió aumentar la producción y calidad de los huevos (Izquierdo *et al.*, 2001; Watanabe y Vasallo-Agius, 2003).

Los resultados de estos estudios permitieron reconocer, que el contenido de ácidos grasos esenciales (DHA, EPA y ArA) y el balance entre ellos en el alimento de reproductores de peces marinos, afectan directamente el contenido de estos en el huevo durante el proceso de vitelogénesis y que las necesidades de estos nutrientes en los reproductores es particular para cada especie, por lo que es necesario realizar estudios para establecer los requerimientos de estos nutrientes en cada especie que se intente cultivar (Sargent *et al.*, 1999). Estos estudios han permitido establecer los requerimientos de las especies de importancia comercial estudiadas y ello a su vez, las estrategias de alimentación para lograr una nutrición óptima de los reproductores y asegurar así la calidad de los embriones utilizados para la obtención de juveniles demandados por los centros de producción comercial de esas especies. Esto se refleja en el aumento histórico de la producción de peces marinos a nivel mundial, ya que de acuerdo con las estadísticas la tasa anual media de crecimiento del cultivo de peces marinos a nivel mundial entre el 2000 y 2004 fue de 9.6 %, lo que representó una producción de 1 376,761 toneladas de peces marinos en el 2006, con un valor estimado de \$ 4 139,195 USD (FAO, 2007).

En México, los estudios para el desarrollo del cultivo de peces marinos comenzaron a partir de 1990, con el realizado por Matus-Nivón *et al.* (1990) en el cual se evaluaron el potencial de cultivo de varias especies locales mediante la valoración de diferentes aspectos de su desarrollo inicial. Posteriormente se publicaron informes editados por la Secretaría de Pesca y el Instituto Nacional de

Pesca en colaboración con diferentes instituciones, en los cuales se describieron métodos para el cultivo de *Paralabrax maculatofasciatus* (Cadena-Roa y Roldan-Liebenson, 1994; Avilés-Quevedo *et al.*, 1995; Avilés-Quevedo y Mazón-Suástegui, 1996), *Totoaba macdonaldi* (Barrera-Guevara *et al.*, 1994), *S. ocellatus* (Arredondo-Figueroa *et al.*, 1994), *Seriola lalandi* (= *S. dorsalis*) (Arredondo-Figueroa *et al.*, 1994; Avilés-Quevedo y Castelló-Orvay, 2004), *Caranx caninus* (= *C. hippos*) (Arredondo-Figueroa *et al.*, 1994), Centropomidae (Muhlía-Melo *et al.* 1994; Avilés-Quevedo y Mazón-Suástegui, 1996), *Lutjanus peru*, *L. guttatus*, *L. aratus*, *L. argentiventris* (Avilés-Quevedo y Mazón-Suástegui, 1996). Sin embargo, en estos documentos la información que se presenta no es precisa y solo describen métodos artesanales habituales en el cultivo de peces para autoconsumo familiar, y no describen los fundamentos científicos y tecnológicos necesarios para soportar el desarrollo y operación de la tecnología para la producción a escala comercial de las especies mencionadas. Por lo que el cultivo de peces marinos a escala comercial en México es prácticamente inexistente.

Recientemente, en diferentes centros de investigación se han realizado estudios que abordan diferentes aspectos de cultivo de *Sphoeroides annulatus* (Duncan *et al.*, 2003; García-Ortega *et al.*, 2003; Komar *et al.*, 2004), *L. peru* (Pintos-Terán *et al.*, 2003; Dumas *et al.*, 2004), *L. guttatus* (García-Ortega *et al.*, 2005) y *Mycteroperca rosacea* (Gracia-López *et al.*, 2004a y b, 2005). Sin embargo, a la fecha los estudios realizados en estas especies son escasos e insuficientes para lograr la producción de las mismas a nivel comercial.

Actualmente en México, *P. maculatofasciatus* es la especie de pez marino, que cuenta con mayor investigación sobre los aspectos biológicos necesarios para el desarrollo de su biotecnología de cultivo intensivo. Se han desarrollado métodos confiables para inducir al desove voluntario y producir embriones de buena calidad en cualquier época del año, por medio de técnicas no invasivas (control fototérmico) y alimentación a base de alimento fresco (Rosales-Velázquez *et al.*, 1992; Rosales-Velázquez, 1997). Asimismo, se ha logrado establecer las necesidades de proteína y

de AGE de reproductores y el establecimiento de técnicas para la evaluación eficiente de la calidad de embriones y larvas (Martínez-Brown, 2007).

Se han realizado estudios para desarrollar un protocolo de cultivo de larvas, lo cual ha permitido realizar estudios enfocados a la fisiología enzimática y nutricional, anatomía digestiva, ecomorfofisiología y conducta de larvas, dirigidos a aumentar su supervivencia y lograr la sustitución parcial del alimento vivo con alimento artificial (Alvarez-González *et al.*, 2001b; Alvarez-González *et al.*, 2001c; Alvarez-González, 2003; Rodríguez-Trejo *et al.*, 2004; Carrasco-Chávez *et al.*, 2005; García-Gómez *et al.*, 2005; Olalde-Rodríguez *et al.*, 2005; Civera-Cerecedo *et al.*, 2007; Peña *et al.*, 2003, 2004, 2005a y 2005b). Así mismo, se han realizado estudios nutricionales en juveniles durante la etapa de preengorda, para la determinación de sus requerimientos y la elaboración de alimentos balanceados (Anguas-Vélez *et al.*, 2000a, 2000b, Alvarez-González *et al.*, 2001a; Carrasco-Chávez, 2004; Tovar-Ramírez *et al.*, 2005).

Sin embargo, para poder escalar a nivel comercial los métodos de cultivo de *P. maculatofasciatus* generados a escala experimental, es necesaria la optimización en las etapas que conforman el ciclo productivo. Uno de los principales problemas en la etapa de reproducción es la dependencia del alimento fresco en la nutrición de reproductores, lo cual es inconveniente debido a que su composición es variable, su disponibilidad insegura, presenta altos costos asociados a su almacenamiento (congelación) y un alto riesgo como trasmisor de patógenos (Watanabe y Vasallo-Agius, 2003). Esto afecta negativamente la calidad de embriones necesarios para satisfacer la demanda de juveniles de los sistemas de producción masiva de peces marinos y su variabilidad no permite la proyección de los ciclos de cultivo a lo largo del año (Luquet y Watanabe, 1986). En el presente trabajo se pretende contribuir al conocimiento del efecto del contenido de ácido araquidónico sobre aspectos del desempeño reproductivo y la calidad de embriones y larvas de *P. maculatofasciatus*, y esto forma parte de una serie de estudios encaminados a determinar los requerimientos nutricionales de los reproductores de esta especie, con el objeto de sustituir el alimento fresco por uno artificial completo.

2. Antecedentes

2.1. Aspectos biológicos de la especie de estudio

2.1.1. Distribución geográfica

La especie *P. maculatofasciatus*, se distribuye desde la bahía de Monterey, California hasta Mazatlán, Sinaloa, incluyendo el Golfo de California. Ésta especie es de hábitos demersales, se asocia a arrecifes planos cubiertos con vegetación, adyacentes a fondos arenosos, y se le encuentra desde la zona intermareal hasta los 60 m de profundidad (Allen y Roberson, 1998; Thomson *et al.*, 2000).

2.1.2. Reproducción

P. maculatofasciatus es un desovador pelágico crepuscular (Oda *et al.*, 1993) que de acuerdo a la clasificación de los estilos reproductivos (Balon, 1990) se ubica en la sección etológica de los no protectores, en el grupo ecológico de los esparcidores de huevos y en el gremio de los pelagófilos, el cual es el estilo reproductivo característico de las especies que como ésta, producen huevos oligolecitos y aún presentan un período larvario en su ontogenia (ontogenia indirecta) (Balon, 1999). Presenta desarrollo ovárico asincrónico, lo que posibilita la conducta reproductiva iterópara, con una frecuencia de desove de uno a dos días en la temporada reproductiva y una fecundidad parcial promedio de 10,300 óvulos por desove (Lluch-Cota, 1995). Puede presentar diferentes patrones sexuales, como el hermafroditismo protogínico secuencial o gonocorismo secundario (Hovey y Allen, 2000), los cuales están en función de la estructura poblacional (densidad) y de las jerarquías sociales dentro de la población, lo cual determina a su vez el sistema de apareamiento, tal como el desove en pareja, en grupo o con la participación de machos furtivos (Miller y Allen, 2006).

2.1.3. Hábitos alimentarios

P. maculatofasciatus, al igual que otros miembros de la familia Serranidae, es un carnívoro generalista con actividad depredadora diurna. La dieta de esta especie varía, por un lado, de acuerdo al período ontogénico y la talla, y por otro, a la disponibilidad de las presas, que depende de la región donde habita y la estación del año. Por lo que, como consecuencia de su fuerte afinidad al sitio donde habita, es capaz de producir diferentes secuencias cinemáticas

(multiplicidad moduladora) para capturar a sus presas, dependiendo del grupo taxonómico y tipo de movilidad de éstas (Ferry *et al.*, 1997). En general, las presas reportadas en los estudios de hábitos alimentarios de *P. maculatofasciatus* son huevos, juveniles o adultos de peces de las familias Atherinidae, Gobiidae, Blenniidae, Gerreidae (*Eucinostomus* spp.), Pleurenictidae, Syngnathidae, Sciaenidae, Labridae, Serranidae, Fundulidae y Clupeidae, crustáceos (anfípodos, misidáceos, isópodos y decápodos), moluscos (poliplacóforos, bivalvos, gasterópodos, cefalópodos), anélidos (poliquetos), equinodermos, hidrozooos, nemertinos y equiúridos (Allen *et al.*, 1995; Ferry *et al.*, 1997; Mendoza-Carranza y Rosales-Casián, 2000).

2.2. Aspectos sobre los ácidos grasos en peces

2.2.1. Requerimientos de ácidos grasos esenciales en peces

Todas las especies de vertebrados, tienen requerimientos de ciertos ácidos grasos poliinsaturados, que deben ser suministrados por los lípidos en la dieta (Sargent *et al.*, 1995). Cuando un animal sujeto a una dieta deficiente en uno o varios ácidos grasos, y experimenta como consecuencia una disminución en el crecimiento, alteraciones en la reproducción y patologías diversas, se considera que es un ácido graso esencial (AGE). Este término incluye, a los ácidos grasos de la serie n-6 derivados del ácido linoléico (18:2 n-6) y de la serie n-3 derivados del ácido linolénico (18:3 n-3) (Sargent *et al.*, 1995; Sargent *et al.*, 2002).

Los requerimientos de ácidos grasos esenciales (AGE) entre las especies de peces de agua dulce y marinos, varían tanto cualitativamente como cuantitativamente, ya que en los peces de agua dulce los requerimientos de AGE pueden ser provistos por el ácido linolénico y linoléico. Mientras que en los peces marinos los requerimientos de la serie n-3 son provistos por el ácido eicosapentaénoico EPA (20:5 n-3) y el ácido docosahexaénoico DHA (22:6 n-3) y de la serie n-6, por el ácido araquidónico ArA (20:4 n-6) (Watanabe, 1993; Rainuzzo *et al.*, 1997; Sargent *et al.*, 2002; Bell y Sargent, 2003).

Estas diferencias en los requerimientos de ambos grupos, se deben básicamente a la inhabilidad o limitada capacidad de todos los peces marinos que se han estudiado hasta el momento, para convertir el 18:3 n-3 a EPA y DHA y el 18:2 n-6 a ArA (Watanabe, 1993; Sargent *et al.*, 2002; Bell y Sargent, 2003). Esta incapacidad, se debe a una insuficiencia metabólica que ha sido identificada

como, la relativa deficiencia de una o dos enzimas en la vía de conversión, del 18:3 n-3 a EPA, por ejemplo, en el complejo de multienzimas elongasas del C₁₈ al C₂₀ o de la $\Delta 5$ -desaturasa de ácidos grasos. Por otra parte, la deficiencia de una o ambas enzimas, aparte de bloquear la conversión del 18:3 n-3 a EPA, también pueden producir una inhabilidad similar en la conversión de 18:2 n-6 al ArA (Fig. 1) (Bell y Sargent, 2003).

Esta situación es el resultado de una combinación de adaptaciones, a la predominancia de ácidos grasos altamente insaturados (AGAI) en la red alimenticia marina y al estilo de vida carnívoro en prácticamente toda las especies de peces marinos investigadas. Debido a que el fitoplancton y zooplancton marino son capaces de sintetizar AGAI y son particularmente abundantes en EPA y DHA con relación al 18:3 n-3 y 18:2 n-6, por lo tanto los peces que se alimentan de organismos que los consumen, no tienen la necesidad de convertir estos ácidos grasos, los cuales se van incorporando y acumulando a través de las redes tróficas, lo que al parecer ha provocado que su capacidad de conversión se haya perdido durante la evolución, principalmente en los carnívoros estrictos (Sargent *et al.*, 2002).

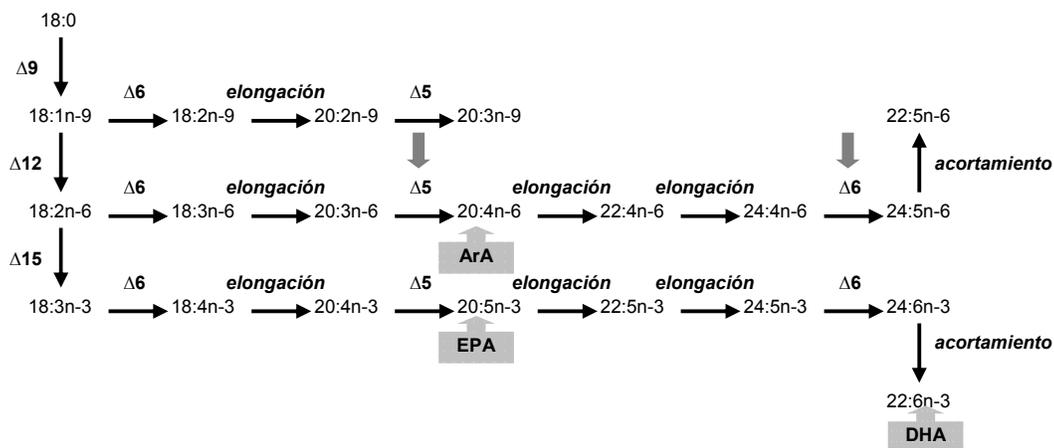


Figura 1. Rutas de biosíntesis de los ácidos grasos altamente insaturados (AGAI) de C₂₀ y C₂₂ a partir de los precursores n-3, n-6 y n-9.

La $\Delta 9$ se encuentra presente tanto en plantas como en animales mientras que la $\Delta 12$ y $\Delta 15$ sólo en plantas, por lo tanto el 18:2 n-6 como el 18:3 n-3 son esenciales para los animales, principalmente en peces de agua dulce. Mientras que los animales carnívoros como la mayoría de los peces marinos tienen una limitada capacidad de convertir el ArA, EPA y DHA, por una deficiencia en las enzimas elongasas y desaturasas que pueden ser la $\Delta 5$ o $\Delta 6$ (flechas grises). Esta limitación puede variar entre las especies, en algunos peces la $\Delta 5$ está presente y pueden sintetizar EPA, sin embargo, la síntesis se trunca y sólo pueden alargar hasta el 22:5 n-3 y no pueden continuar la síntesis hasta DHA (Tocher, 2003).

2.2.2. Funciones de los AGAI en los vertebrados

Las funciones de los AGAI en los peces marinos, coinciden con su función en la mayoría de los vertebrados, las cuales se han catalogado en dos áreas principales: en el mantenimiento de la estructura y funcionamiento de las membranas celulares y como precursores de eicosanoides, que son un grupo heterogéneo de sustancias de alta actividad biológica, las cuales se especifican en la Tabla 1 (Gurr y Harwood, 1991; Sargent *et al.*, 1995).

Tabla 1. Principales funciones de los ácidos grasos altamente insaturados (ArA, EPA y DHA) en los vertebrados.

Ácido graso	Funciones
ArA 20:4 n-6	Precursor de Eicosanoides ^{1, 2, 3, 4} <ul style="list-style-type: none"> • Prostanoides de la serie-2 • Leucotrininos de la serie-4
	Funciones específicas de los eicosanoides derivados del ArA <ul style="list-style-type: none"> • Intervienen en varias reacciones en respuesta al estrés ^{1, 2, 3, 4, 5} <ul style="list-style-type: none"> Coagulación de la sangre Reacciones inflamatorias Regulación de la respuesta inmune
	Otras funciones del ArA <ul style="list-style-type: none"> • Importante papel, en las biomembranas de los tejidos excretores de sal ^{1, 2, 3, 4} • El ArA localizado en los tejidos, en la posición-2 del glicerol, del fosfatidil-inositol, interviene en muchas áreas en la trasducción de señales celulares ^{2, 4}
EPA 20:5 n-3	Precursor de eicosanoides ^{1, 4} <ul style="list-style-type: none"> • Prostanoides de la serie-3 • Leucotrininos de la serie-5
	Funciones específicas de los eicosanoides derivados del EPA ^{1, 4} <ul style="list-style-type: none"> • Intervienen en la regulación de la respuesta inmune y reacciones en respuesta al estrés • Son menos activos biológicamente que sus homólogos de la serie-2 y serie-4
DHA 22:6 n-3	Funciones específicas del DHA <ul style="list-style-type: none"> • Es el componente mayoritario en las membranas celulares ¹ • Mantiene la integridad de las membranas celulares ^{1, 3} • Se encuentra presente en gran cantidad en la membrana de los bastoncillos de la retina, por lo que se asocia al funcionamiento de la visión ^{1, 3} • Se encuentra presente en gran cantidad en las membranas neurales o del sistema nervioso central de los peces ^{1, 3}

¹ Sargent *et al.*, 1995; ² Izquierdo, 1996; ³ Mourente *et al.*, 1999; ⁴ Evans *et al.*, 2000; ⁵ Bell y Sargent, 2003.

2.2.3. Importancia del estudio de lípidos y ácidos grasos

En las pasadas dos décadas ha habido un mayor ímpetu en estudiar los lípidos marinos, debido al interés de la industria de la acuicultura por entender los requerimientos nutricionales de lípidos en los peces cultivados, para optimizar su producción (Tocher, 2003).

Al analizar el campo de la nutrición en peces, aparentemente existe mas información sobre la importancia de los lípidos, que en relación a otros nutrientes. Una segunda impresión es que los lípidos son el nutriente mas importante para los peces. Sin embargo, esto es un error, ya que para los peces los lípidos no son ni mas ni menos importantes que otros grupos de nutrientes, como las proteínas, carbohidratos, vitaminas o elementos inorgánicos (Sargent *et al.*, 2002).

La situación actual es que probablemente se conoce menos acerca de los requerimientos nutricionales de los peces en materia de lípidos. Este desconocimiento se debe a la complejidad en la química de los lípidos. Para el año 2000 ya se contaba con un entendimiento detallado de la bioquímica de los aminoácidos y carbohidratos en cuanto a las rutas biosintéticas y catabólicas, enzimología, biología molecular y genética, así como un conocimiento detallado en sus aspectos nutricionales. En contraste en los lípidos, aun se encuentran definiendo las rutas anabólicas y catabólicas de ciertos ácidos grasos particulares, especialmente los ácidos grasos poliinsaturados (AGPI), además que no existe suficiente información sobre la enzimología, biología molécula y genética de los AGPI (Sargent *et al.*, 2002).

Las interacciones enzima-sustrato en el metabolismo de los carbohidratos, proteínas y ácidos nucleicos depende de reacciones catalizadas por enzimas altamente específicas. Sin embargo, las interacciones enzima-sustrato en el metabolismo de lípidos y ácidos grasos involucra enzimas menos específicas.

Esto tiene como resultado que la composición de aminoácidos en las proteínas sea menos variable lo cual refleja la alta especificidad en el acoplamiento con la transferencia de RNAs en la síntesis de proteínas. En contraste, la composición relativamente variable de ácidos grasos en los triglicéridos, grasas y aceites, refleja la incorporación poco específica de ácidos grasos en estos lípidos (Sargent *et al.*, 2002).

2.3. Estudios sobre nutrición de reproductores

2.3.1. Estudios sobre requerimientos de ácidos grasos esenciales

Los primeros estudios realizados para establecer los requerimientos de ácidos grasos esenciales en los reproductores, consideraban solo el nivel de AGAI n-3 (DHA y EPA) en el alimento (Izquierdo *et al.*, 2001). Entre los más importantes, destaca el realizado por Harel *et al.* (1994) en el cual probaron en reproductores de *Sparus aurata*, alimentos que contenían arriba del 1 % de AGAI n-3 y observaron que la composición de los órganos asociados con la reproducción en las hembras, fue modificada por la cantidad de AGAI n-3 en el alimento y obtuvieron efectos favorables en la calidad de los huevos en un corto período.

Por su parte, Fernández-Palacios *et al.* (1995) encontraron que la composición y calidad de los huevos son afectados por la concentración AGAI n-3 en el alimento de los reproductores, con solo haberlo consumido durante tres semanas. Lo que sugiere que los AGAI n-3 dietéticos son fácilmente incorporados en los huevos y que la calidad de los desoves en esta especie puede ser mejorada modificando la calidad nutricional del alimento de los reproductores.

Sin embargo, trabajos posteriores hacen énfasis en la importancia de considerar no sólo el requerimiento de ácidos grasos esenciales de manera cuantitativa, sino también la proporción y los niveles individuales en que deben ser requeridos cada uno de ellos (Sargent *et al.*, 2002).

Por ejemplo, Sorensen *et al.* (1998), encontraron que las cantidades de EPA y ArA en el alimento están correlacionadas a la tasa de fecundación en los reproductores de *Sparus aurata*. Estos dos ácidos grasos producen prostaglandinas, que actúan en muchos casos como feromonas que estimulan el comportamiento sexual en los machos y estimulan la sincronización de los desoves en hembras y machos, lo cual afecta directamente el éxito en la fecundación.

Con el propósito de evaluar el efecto de los lípidos del alimento de los reproductores de *Dicentrarchus labrax* sobre la composición de ácidos grasos de los embriones y la sobrevivencia larvaria, Bell *et al.* (1997) probaron un alimento formulado que contenía 0.13 % de ácido araquidónico (ArA) y un alimento fresco que contenía 0.48 % de ArA, ambos alimentos con niveles similares de DHA (2.3 %). Encontraron que los embriones de los peces alimentados con alimento fresco,

tenían mejor sobrevivencia y contenían más ArA y DHA en comparación con los alimentados balanceados. Con base a esto, sugirieron incrementar el nivel de DHA y ArA en el alimento de reproductores de *Dicentrarchus labrax* para mejorar la calidad y supervivencia de las larvas.

Posteriormente, Mazorra *et al.* (2003) con el objetivo de sustituir el alimento fresco por alimento formulado para alimentar reproductores de *Hippoglossus hippoglossus*, realizaron dos experimentos para determinar la importancia y optimizar la composición de ArA, EPA y DHA. En el primero probaron una mezcla de carne de pescado, calamar, aceite de pescado y vitaminas como alimento fresco (control) y dos alimentos balanceados, uno hecho con harina de krill, pescado y aceite de pescado, otro con harina de pescado y aceite orbital de atún (AOA) alto en DHA y ArA. En el segundo experimento probaron un alimento balanceado hecho con harina de pescado y suplementado con aceite de pescado como alimento control y otro con la misma composición de la dieta control pero suplementado con aceite con alto contenido de ArA (18 % de AGT). En ambos experimentos encontraron que la composición de DHA de los embriones obtenidos con los alimentos balanceados fue similar, a pesar que el nivel de este ácido graso en ambos alimentos fue diferente, lo que sugiere una acumulación selectiva de DHA en el vitelo. Asimismo, observaron una tendencia a incrementar la concentración de ArA y una disminución de la proporción EPA/ArA en embriones obtenidos con alimento fresco y el que contenía harina de krill, sugiriendo también una preferencia en la incorporación de ArA con respecto al EPA. Esto sugiere la importancia del balance de los AGE y la importancia del requerimiento específico de ArA en los reproductores. Se encontró un efecto positivo en la morfología de los blastómeros, fecundación y tasa de eclosión al incrementarse los niveles de ArA en los peces alimentados con dietas altas en ArA. No encontraron diferencias significativas en los criterios de calidad entre el alimento fresco y los alimentos balanceados, probando que los reproductores pueden ser mantenidos y desovar exitosamente con alimentos balanceados.

2.3.2. Estudios sobre requerimientos de ácido araquidónico (ArA) de los reproductores

El caso del ArA como ácido graso esencial es interesante, ya que hasta hace pocos años comenzó a considerarse como importante para los peces marinos. Esto se debe a que comparativamente con el EPA y DHA, se encuentra en menor concentración en los embriones y tejidos de los peces marinos, por lo que se le había dado poca importancia. Sin embargo, investigaciones recientes han demostrado que el ArA también es necesario como AGE. Existe evidencia que sugiere la importancia del ArA en la reproducción de los peces marinos. Ya que se ha observado que la proporción de ArA/EPA/DHA en el alimento de los reproductores puede mejorar la calidad de los huevos, esto se relaciona con el control de la ovulación, embriogénesis, desarrollo del sistema inmune, eclosión, resistencia al estrés y el desarrollo inicial de la larva (Bell y Sargent, 2003; Furuita *et al.*, 2003).

Con el propósito de evaluar el efecto de los lípidos del alimento de los reproductores de *Dicentrarchus labrax* sobre la composición de ácidos grasos de los huevos, Bell *et al.* (1997) alimentaron a un grupo de peces con un alimento formulado con aceite de maíz y de pescado y a otro grupo con pescado en trozos como alimento fresco. El alimento formulado contenía 1.3 mg/g de ácido araquidónico (ArA) con una relación ArA/EPA 0.1 y el alimento fresco contenía 4.8 mg/g de ArA, en una relación ArA/EPA de 0.7. Ambos presentaron niveles similares de DHA (23 mg/g). Encontraron que los embriones de los peces alimentados con pescado, contenían más ArA y DHA y la relación ArA/EPA fue cinco veces mayor en comparación con los alimentados con alimento formulado. Con base a esto, sugirieron que incrementar la relación DHA/EPA y ArA/EPA podría mejorar la calidad y supervivencia de las larvas de *Dicentrarchus labrax*.

Por su parte, Salze *et al.* (2005) compararon el contenido de lípidos totales, la composición de clases de lípidos y los ácidos grasos y pigmentos en embriones obtenidos de reproductores silvestres y producidos en cautiverio, ambos grupos alimentados con un alimento balanceado enriquecido. Encontraron que los embriones con mejor desarrollo, mejor tasa de fertilización, mejor simetría y sobrevivencia a la eclosión fueron producidos por los reproductores silvestres. Estos estuvieron caracterizados por un alto contenido de ArA, fosfatidil inositol y pigmentos, con respecto a los huevos de los reproductores producidos en

cautiverio. Sugieren que es necesario complementar la alimentación de los reproductores con una mayor cantidad de ArA.

Con el propósito de determinar el efecto del ArA sobre la maduración y el desove de reproductores de *Lutjanus argentimaculatus*, Emata *et al.* (2003) realizaron un estudio probando tres alimentos balanceados. El alimento 1 se elaboró con 35 % de harina de pescado, 25 % de harina de soya, 4 % de aceite de hígado de bacalao, 4 % de aceite de soya, 15 % de harina de trigo y 10 % fibra de arroz, mezcla de vitaminas y minerales. El alimento 2 presentó la misma composición base del alimento 1, pero enriquecido con una mezcla de vitamina C y E, glutatión, cloruro de colina y lecitina de soya. El alimento 3 presentó la misma composición del alimento 2, pero sustituyendo la harina de soya por harina de calamar y sustituyendo en un 50 % las otras fuentes de lípidos por aceite de calamar. Los resultados que obtienen muestran que con el alimento 3, se obtuvo un mayor número de desoves y producción de huevos. Los promedios de la viabilidad de los huevos y normalidad de las larvas fue similar entre los tratamientos, sin embargo, con el alimento 3 se obtuvo una tasa de eclosión significativamente mayor, sobrevivencia acumulada y mayor índice de sobrevivencia de actividad que con los alimentos 1 y 2. El mejoramiento del desempeño reproductivo con el alimento 3, se le atribuye a la adición de la harina y aceite de calamar. En el estudio concluyen que la mayoría de los perfiles de ácidos grasos de los peces tropicales muestran un nivel de ArA de intermedio a alto, con bajos niveles de EPA, en comparación con las especies del hemisferio norte o aguas templadas, por lo tanto el ArA puede ser nutricionalmente mas importante para el desarrollo y sobrevivencia de huevos y larvas de peces marinos tropicales que para las especies de aguas frías.

Por su parte, Furuita *et al.* (2003), determinaron el efecto de diferentes niveles de ArA (0.1, 0.6, 1.2 %) en el alimento de reproductores de *Paralichthys olivaceus*, manteniendo el mismo nivel de AGAI-n3. Encontraron que la inclusión de 0.6 % de ArA en el alimento, mejora la calidad de los huevos, sin embargo, la reproducción se ve afectada negativamente con altas dosis de ArA (1.2 %). Esto indica que son necesarias pequeñas cantidades de ArA, para un crecimiento y desarrollo normal, pero una sobredosis tiene un afecto negativo en los peces a través del mecanismo de producción de eicosanoides. En la composición de los embriones encuentran, una tendencia que sugiere la selectividad de las enzimas

acyl transferasas que sintetizan los fosfolípidos y su sustrato preferencial es el ArA sobre el EPA. En contraste, el EPA y el DHA no presentaron diferencias en ambas fracciones de lípidos independientemente del nivel de ArA en los alimentos, lo cual sugiere que el contenido de EPA de los embriones es más sensible al cambio dietario que el DHA y que un incremento en el EPA en los huevos se debe a un incremento en el alimento de los reproductores.

2.3.3. Estudios sobre nutrición de reproductores de *Paralabrax maculatofasciatus*

Existen pocos antecedentes en México sobre la realización de trabajos en nutrición de reproductores de peces marinos.

El primer trabajo sobre el que se tiene registro es el realizado por Avilés-Quevedo *et al.* (1995) en el Centro Regional de investigaciones Pesqueras de La Paz, en el cual probó dietas semi húmedas, en reproductores de *Paralabrax maculatofasciatus*.

A pesar de que los reproductores de esta especie pueden mantenerse y desovar de manera exitosa con alimento fresco, esto puede resultar poco práctico debido a las complicaciones de obtención y almacenamiento así como inestabilidad de vitaminas y grasas, que puede afectar la calidad del alimento fresco y la salud de los reproductores.

Por lo tanto, Rosales-Velázquez (1997) propuso desarrollar un alimento balanceado que cubriera los requerimientos nutricionales para una reproducción exitosa. Para esto probó dos alimentos, uno con 35 % y otro con 50 % de proteína y los comparó a cada uno en dos experimentos con el alimento fresco que consistió en juveniles de mojarra, evaluando su efecto sobre los desoves, el factor de condición simple, índice gonadosomático, los gametos producidos y la calidad de los desoves obtenidos. Obtuvo un mejor desempeño reproductivo en los peces alimentados con mojarra, que en los alimentados con los alimentos balanceados. Obteniendo con la mojarra un mayor número de huevos fecundados y el porcentaje promedio de huevos fecundados, también una mayor frecuencia de desoves y mayor volumen de huevos desovados y fecundados. En cuanto a la viabilidad de los desoves, no se presentaron grandes diferencias en los porcentajes de eclosión y sobrevivencia al absorber el vitelo. Esta disminución en la calidad de los desoves con los alimentos, los atribuye a un exceso de la

presencia de ácidos grasos como 18:2 n-6, el cual es aportado en su mayor parte por los ingredientes de origen vegetal incorporados de manera abundante en la composición de los alimentos probados, por lo tanto propone como recomendación realizar un análisis de la calidad de ácidos grasos y aminoácidos presentes en los alimentos que se utilicen. También recomienda el uso de una mayor cantidad de ingredientes de origen marino en la elaboración de alimentos. Sugiere emplear la mojarra como referencia de la calidad y contrastarla con alimentos de diferentes niveles de proteína y lípidos, así como la evaluación de la composición de huevos y larvas, para determinar el efecto de la alimentación en reproductores.

A partir de las recomendaciones realizadas por Rosales-Velázquez (1997), con el fin de mejorar la alimentación de reproductores de cabrilla arenera y debido a la falta de información sobre los requerimientos nutricionales principalmente de lípidos y proteínas, Martínez-Brown (2007) realizó un experimento cuyo objetivo fue determinar el efecto de diferentes niveles de inclusión de ácidos grasos esenciales y proteínas en el alimento de reproductores y evaluar su efecto sobre la calidad de embriones y larvas. Para esto, probó tres alimentos cuyos niveles de AGE fueron de 0.5, 1.2 y 1.9 % con 45 % de proteína cada uno, y otros tres alimentos con los mismos niveles de AGE pero con 55 % de proteína. Otra aportación importante de este trabajo, fue la utilización por primera vez, de diversos criterios para determinar el efecto del alimento sobre los reproductores y calidad de embriones y larva. Utilizó como parámetros reproductivos, fecundidad parcial e índice de viabilidad de los embriones. Como parámetros morfológicos de embriones y larvas, morfología de los blastómeros, morfología de embriones y longitud notorcordal de larvas. Índices zootécnicos, la tasa de eclosión, transformación larvaria, normalidad larvaria, sobrevivencia al estrés osmótico, sobrevivencia a la inanición y normalidad larvaria a la inanición. También determinó la composición de los alimentos antes y después del experimento y la composición de embriones obtenidos durante el experimento con los distintos alimentos. Este autor encontró que el nivel de proteína de los alimentos balanceados y fresco no afectó parámetros como la fecundidad parcial, viabilidad y calidad de embriones y larvas, por lo que sugiere que un nivel de proteína del 45 % es suficiente para el mantenimiento de reproductores. Encontró también que el contenido de ArA y EPA en los embriones se vió mas afectado por la composición

de los alimentos balanceados y fresco, mientras que el resto del perfil de ácidos grasos presentó una composición similar en los embriones a pesar de variar en los alimentos. Observó que la sobrevivencia larvaria al estrés osmótico y la morfología de los blastómeros tuvieron una mayor relación con el contenido de ArA y la razón ArA/EPA de los alimentos, ya que los mejores resultados de estos criterios fueron obtenidos con mojarra.

Debido a la importancia del ArA sobre la calidad de embriones y larvas obtenidas con alimento fresco, se genera al presente trabajo que pretende elucidar el efecto particular del ArA en el alimento de reproductores sobre el desempeño reproductivo y calidad de embriones y larvas.

3. Justificación

Uno de los problemas fundamentales para el desarrollo del cultivo comercial de peces marinos es la producción controlada de embriones de buena calidad, con los cuales se pueda obtener una producción estable de los juveniles necesarios para satisfacer las necesidades de los centros de producción comercial. En la actualidad, en México se están realizando estudios para poder desarrollar tecnologías de cultivo de especies nativas de peces marinos, sin embargo, la producción aún se mantiene a escala experimental. *P. maculatofasciatus* es una de las especies de peces marinos que cuenta con 17 años de investigaciones sobre los aspectos biológicos necesarios para su cultivo. Con los resultados obtenidos de estas investigaciones se ha logrado cerrar su ciclo de producción a escala experimental. Uno de los principales avances para el desarrollo del cultivo de esta especie ha sido el lograr la maduración, ovulación y desove continuo y voluntario a lo largo del año, mediante la manipulación del régimen fototérmico. Sin embargo, son pocos los estudios sobre los requerimientos nutricionales de esta especie durante su ciclo reproductivo, en comparación con otras especies de peces marinos cultivados comercialmente en Europa y Asia, en las cuales se ha demostrado que es posible lograr la producción de embriones de buena calidad al alimentar a los reproductores con alimentos balanceados de presentación semihúmeda o seca, evitando en mayor medida la utilización del alimento fresco para la nutrición de reproductores y evitando con ello, los problemas propios de este tipo de alimento, tales como su disponibilidad variable, su composición química variable y el de ser vector de patógenos potenciales, así como los costos de su almacenamiento. Sin embargo, para poder formular un alimento balanceado que sustituya el alimento fresco en la alimentación de reproductores, sin que esto tenga consecuencias negativas sobre la calidad de los embriones, es necesario conocer los requerimientos nutricionales de los reproductores de esta especie. Por esto, y atendiendo a las recomendaciones propuestas por Martínez-Brown (2007), el presente estudio pretende determinar el nivel más adecuado de ácido araquidónico en el alimento balanceado de reproductores de *P. maculatofasciatus*, y de esta manera contribuir con parte de la información necesaria para la formulación de un alimento artificial completo para reproductores de esta especie.

4. Hipótesis

A medida que el nivel del ácido araquidónico en el alimento balanceado, se acerque al requerimiento nutricional de los reproductores de *Paralabrax maculatofasciatus*, se obtendrán mejores resultados en la calidad de embriones y larvas, en términos de morfología de los blastómeros, sobrevivencia larvaria y sobrevivencia al estrés osmótico.

5. Objetivos

5.1. Objetivo general

Determinar el efecto de diferentes niveles de inclusión de ácido araquidónico en el alimento de reproductores de *Paralabrax maculatofasciatus*, sobre la calidad de embriones y larvas.

5.2. Objetivos particulares

Evaluar y comparar el efecto de 4 alimentos experimentales que contienen diferentes niveles de ácido araquidónico (0.17, 0.39, 0.68 y 0.26%), sobre:

- a) parámetros reproductivos (fecundidad parcial y viabilidad).
- b) parámetros morfológicos de embriones (morfología de los blastómeros).
- c) índices zootécnicos en embriones y larvas (tasas de eclosión, supervivencia larvaria a la transición larvaria, al estrés hiperosmótico agudo y a la inanición).
- d) la composición de ácidos grasos de los embriones.

6. Material y métodos

6.1. Descripción del Sistema Cerrado de Inducción al Desove

El Sistema Cerrado de Inducción al Desove (SCID) es parte del Laboratorio de Biología Experimental del Centro Interdisciplinario de Ciencias Marinas (CICIMAR-IPN). El SCID está diseñado para mantener el control de la calidad del agua, temperatura y fotoperíodo, con lo cual es posible inducir a la maduración gonádica, ovulación y desove, de manera voluntaria y continua de reproductores de *Paralabrax maculatofasciatus*.

En la Fig. 2, se observa el diseño del SCID, el cual está compuesto de seis tanques cilíndricos de fibra de vidrio de 1,100 l de capacidad, con la superficie interior cubierta con *gel coat* azul y fondo plano. Cada tanque tiene en el centro un tubo de PVC de 3.81 cm de diámetro, el cual mantiene una columna de agua de 1 m de profundidad y permite el drenaje superficial constante. El agua que drena de cada tanque pasa a través de tuberías independientes de PVC de 3.81 cm a un tanque cilíndrico de 150 l, donde se colocan a la salida de cada tubo los recolectores de embriones, que consisten en cilindros de PVC de 20.32 cm de diámetro y 30 cm de altura con ventanas cubiertas con malla de 500 μm . A su vez, este tanque de recepción funciona como tanque de precipitación de sólidos y presenta en el centro de su fondo un tubo de PVC de 5.08 cm de diámetro y 50 cm de largo que mantiene el drenaje superficial. El agua que se drena de éste tanque pasa hacia un tanque reservorio de 100 l. El agua del reservorio es bombeada por una bomba centrífuga (Jacuzzi[®], modelo S7LR-5-S1; 0.7 hp) hacia una serie de filtros. El primero es un filtro mecánico de arena con capacidad para retener partículas de 200 μm (Sta-Rite[®], 100 lbs, 1.26 ft², 25.5 gal/min). Posteriormente, una parte del agua pasa por un espumador para separar coloides (p.e. albúminas y grasas), el resto del agua retorna por una válvula hacia el reservorio. Después de pasar por el espumador, el agua llega a un filtro biológico de columna empacada con bioesferas, en donde se oxidan los desechos nitrogenados ($\text{NH}_3\text{-NH}_4^+$), y posteriormente pasa a una unidad de desinfección por radiación UV (Aquanetics[®], 8 lámparas de 30 W), para el control microbiológico. Después de pasar el agua por el sistema de filtros, fluye a través de

una tubería de PVC hacia cada tanque. Este sistema de distribución se ubica sobre el nivel de los tanques y el flujo de agua hacia ellos se controla por medio de válvulas de esfera. El área donde se ubica el SCID cuenta con una toma de agua dulce y una toma de agua de mar. El agua de mar es bombeada de un pozo en la playa, por medio de una bomba centrífuga (RK2, B719, 1 hp), a dos tanques comunicantes elevados (Tinaco Rotoplas[®] de 1000 l), que por gravedad distribuyen el agua marina a la toma del SCID. Durante los recambios, el agua de mar pasa a través de un filtro de cartucho con capacidad de retención de 200 μm (Culligan[®], modelo HF-360) antes de ingresar al tanque reservorio del SCID.

La temperatura del agua se mantiene alrededor de 21 °C por medio del enfriamiento ambiental con un aire acondicionado minisplit (Daewoo[®], DSA-240L-R). El fotoperíodo se realiza por medio de seis pares de lámparas fluorescentes de luz de día, que se encienden y apagan automáticamente con temporizadores (Master Electrician Variable[®]). Tres pares de lámparas (Osram[®], 39 W) se encienden a las 7:00 horas y se apagan a las 20:00 horas, y tres pares de lámparas (Philips[®], 75 W) se encienden a las 7:30 horas y se apagan a las 19:30 horas, con el objeto de graduar la intensidad de la luz y mantener el fotoperíodo de 13 h luz y 11 h oscuridad.

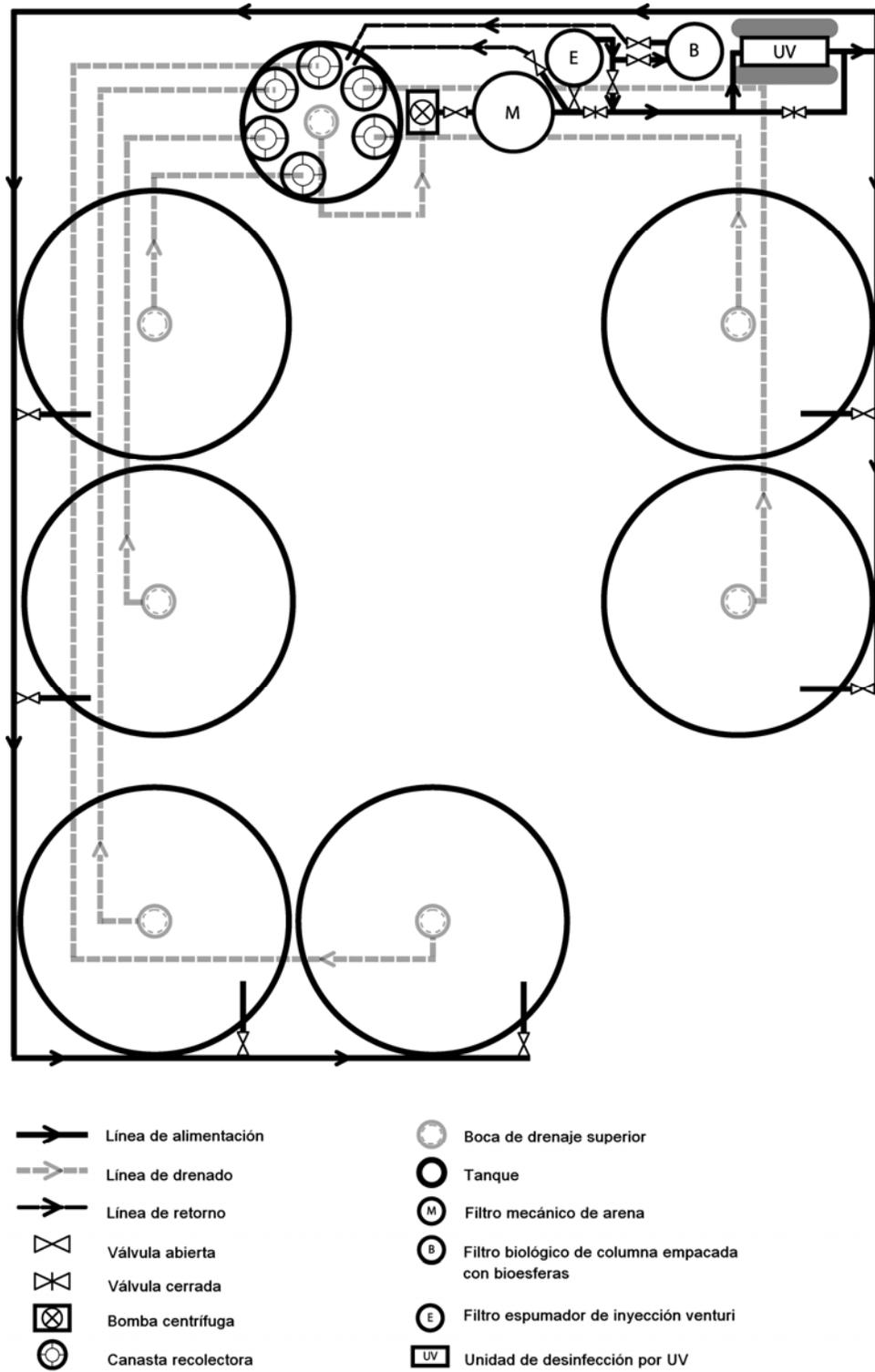


Fig. 2. Esquema del Sistema Cerrado de Inducción al Desove utilizado para experimentación con reproductores de *Parabrax maculatofasciatus*.

6.2. Animales experimentales

6.2.1. Captura

Los reproductores fueron capturados en la Bahía de La Paz, B.C.S. durante dos campañas de muestreo en el mes de febrero de 2007. La primera captura se realizó en el área de “El Merito” y la segunda en el área de “El Mogote”, en ambos casos se empleó para su captura línea de nylon y anzuelo, y calamar gigante (*Dosidicus gigas*) como carnada. Durante la captura y transporte los peces fueron mantenidos en el vivero de la embarcación, el cual estaba equipado con una bomba sumergible (Rule®, pro-series, 1,900 l/h) para mantener un recambio de agua constante. Se capturaron 100 peces, los cuales fueron trasladados al SCID, donde primero fueron sometidos a una inmersión en agua dulce por 10 min, para eliminar los ectoparásitos y posteriormente se distribuyeron aproximadamente 15 individuos por tanque.

Durante la captura, la mayoría de los peces presentaron distensión en la vejiga natatoria, lo que produce que floten ventre arriba, por lo que se les dió un tiempo aproximado de 12 a 24 h, para permitir que se recuperaran, sin realizar la punción abdominal. Después del tiempo de recuperación, se separaron los animales muertos, los que no pudieron recuperarse o los que presentaron heridas.

Los animales recuperados de la captura, se mantuvieron durante un período de cuarentena, durante 30 días.

6.2.2. Tratamiento profiláctico

Durante los primeros tres días previos a la cuarentena, a los peces se les aplicó un tratamiento profiláctico, que consistió en suministrar al agua de mar del SCID una solución de sulfato de cobre quelado con ácido cítrico, a una concentración de 0.57 mg/l (Reichenbach-Klinke, 1982), con la finalidad de eliminar el parásito *Cryptocarion irritans* y evitar posteriores epizootias.

6.2.3. Cuarentena

Al finalizar el tratamiento profiláctico y con el objeto de acondicionar a los peces al cautiverio, se dió un período de cuarentena que duró 14 días. Desde el comienzo de la cuarentena, los peces estuvieron bajo condiciones controladas de fotoperíodo, temperatura y alimentación (alimento fresco a base de juveniles de mojarra *Eucinostomus* spp., proporcionado a saciedad aparente, una vez al día, diariamente) con las que se dió el acondicionamiento reproductivo (Rosales-Velázquez, 1997).

6.2.4. Determinación del sexo y distribución de reproductores en los tanques

Al término de este período, se realizó la determinación del sexo y biometría de los peces. Para esto, los peces fueron anestesiados con una solución de MS-222 (SIGMA-Aldrich) a una concentración de 75 mg/l (Rosales-Velázquez, 1997). Se determinó el peso total en una balanza digital portátil (OHAUS, CS2000; ± 1 g) y longitud patrón con un ictiómetro convencional (± 1 mm). La determinación del sexo se realizó primeramente por presión abdominal, en donde, si se observó la expulsión de semen, se determinó como macho y en los casos que no se pudo determinar así, se utilizó una cánula de polietileno (38.5 cm largo, 2.0 mm diámetro) para ubicar el poro del oviducto. En el caso de no encontrarlo, se determinó macho y en el caso de encontrarlo se introdujo la cánula en el oviducto para verificar la presencia de ovocitos y confirmar el sexo femenino.

Posteriormente, los reproductores se distribuyeron en los tanques para mantener al final 10 peces en cada uno de los seis tanques, con una proporción de sexos de 6 hembras y 4 machos por tanque.

6.3. Alimentos

6.3.1 Alimento fresco

El alimento fresco utilizado fueron juveniles de mojarra del género *Eucinostomus* spp., los cuales se capturaron en las playas adyacentes al CICIMAR, por medio de una red de arrastre de 2 m de alto, 20 m de longitud y luz de malla de 1 cm. Los juveniles de mojarra se capturaron aproximadamente cada 3 días; se les

aplicó un baño con agua dulce durante 30 minutos para eliminar ectoparásitos, se empacaron en bolsas de plástico y se congelaron a -20 °C. Antes de suministrar los juveniles de mojarra a los reproductores, se descongelaron en agua dulce con una solución de plata coloidal estable (BacDym plus®) para su desinfección y se cortaron en trozos de aproximadamente 1 cm para suministrarlos. Se tomaron muestras de juveniles troceados para determinar su contenido de ácidos grasos de acuerdo como se describe en la sección 5.6.3.3.

6.3.2 Alimentos experimentales

6.3.2.1 Formulación

Las formulaciones se realizaron en el Laboratorio de Nutrición Acuícola del CIBNOR con el programa de cómputo Mixit Win v. 4.0. Una vez que se obtuvo la composición química y de ácidos grasos de los ingredientes, como se describe en las secciones 5.6.2 y 5.6.3 respectivamente, se formularon cuatro alimentos experimentales isoproteínicos, isocalóricos e isolipídicos, con niveles fijos de DHA y EPA, y cuatro niveles de ArA (Tabla 2).

Los criterios de formulación se basaron en los resultados obtenidos por Martínez-Brown (2007). Este autor sugirió que el contenido de ArA de la mojarra (0.18 %) afectó positivamente la calidad de los embriones y larvas en términos de morfología de los blastómeros y sobrevivencia de larvas al estrés hiperosmótico agudo. Por lo que en el presente trabajo, el nivel mínimo de ArA fue de 0.14 %, cercano al 0.18 % de la mojarra, y el máximo fue de 1 %, que fue el nivel mayor que se pudo obtener con los ingredientes utilizados. Los dos niveles intermedios (0.42 y 0.71 %) resultaron de la división entre tres, del intervalo que resultó entre el nivel mínimo y máximo. El nivel de EPA de 1 % se fijó en las fórmulas de todos los alimentos experimentales y correspondió al nivel con el que se mantiene la relación ArA/EPA de 1, con el nivel máximo de ArA. El nivel de DHA fijado en las fórmulas de los alimentos experimentales fue de 1.5 % (Martínez-Brown, 2007). El nivel de proteínas fue de 45 % en todos los alimentos experimentales, ya que de acuerdo con Martínez-Brown (2007), este nivel es suficiente para la nutrición de reproductores de *Paralabrax maculatofasciatus*.

Tabla 2. Fórmulas de los alimentos experimentales utilizados con reproductores de *Paralabrax maculatofasciatus*.

Ingredientes (%)	1	2	3	4
Harina de sardina (HP0607-1) ^a	57.53	57.53	57.53	57.53
Harina integral de trigo (HIT0607-1) ^b	20.39	20.39	20.39	20.39
Harina de calamar (HCal0506) ^c	5.00	5.00	5.00	5.00
Hidrolizado de pescado (CPSP0506) ^d	2.00	2.00	2.00	2.00
Aceite de órbita ocular de atún (AOA0608) ^e	6.70	6.70	6.70	6.70
Aceite de bacalao (AB0606) ^f	0.60	0.60	0.60	0.60
Aceite de girasol (AG0605) ^g	2.86	2.00	1.11	0.21
Aceite alto en ArA (Vevodar0606) ^h	0.00	0.86	1.76	2.65
Lecitina de soya (LS0605) ⁱ	1.00	1.00	1.00	1.00
Alginato de sodio (Algimar0606) ^j	2.00	2.00	2.00	2.00
Premezcla de minerales (CIB200) ^k	1.00	1.00	1.00	1.00
Premezcla de vitaminas (NRC1993) ^l	0.70	0.70	0.70	0.70
Cloruro de colina (ICN10138) ^m	0.13	0.13	0.13	0.13
Vitamina C (Stay-C 35 % aa) ⁿ	0.08	0.08	0.08	0.08
BHT (2004 ICN101162) ^o	0.004	0.004	0.004	0.004

^a PIASA, La Paz, Baja California Sur, México; ^b Gluten y Almidones Industriales S.A de C.V.; ^d Francia; ^e Omega-3, CICIMAR-IPN, La Paz, Baja California Sur, México; ^f Farmacias Paris, S.A de C.V., D.F., México, primera clase; ^g Cristal®, Aceites, grasas y derivados, D.F., México; ^h Omega-6, Vevodar®, (*Mortiella alpina*), DSM food specialties, Netherlands (35 % ArA en forma de triglicéridos); ⁱ Pronat ultra®, S.A. de C.V.; ^j ALGIMAR Na-K 56, Alginato de Sodio, pH 8.5, viscosidad 137 cp, CICIMAR-IPN, La Paz, Baja California Sur, México; ^k Premezcla de minerales (mg·kg⁻¹; SIGMA): CaCl₂·2H₂O, 2575; MgSO₄·7H₂O, 1491.4; ZnSO₄·7H₂O, 27.6; MnCl₂·4H₂O, 9.6; CuSO₄·5H₂O, 2.5; KI, 0.0003; Na₂SeO₃, 0.05; Na₂HPO₄, 5715.8; FeSO₄·7H₂O, 178.8; ^l Premezcla de vitaminas (mg·kg⁻¹): Vitamina A (Retinol), 0.602 (ICN); Vitamina D₃ (Colecalciferol), 0.042 (SIGMA); Vitamina E (Tocoferol), 35 (SIGMA); Vitamina K (Menadiona), 7 (SIGMA); Vitamina B₁ (Tiamina), 0.07 (SIGMA); Vitamina B₂ (Riboflavina), 2.8 (SIGMA); Vitamina B₆ (Piridoxina), 2.1 (SIGMA); Ac. DL-Pantoténico, 14 (SIGMA); Niacina (ácido nicotínico), 7 (SIGMA); Biotina, 0.112 (ICN); Inositol, 210 (SIGMA); Vitamina B₁₂ (Cianocobalamina), 0.014 (SIGMA); Vitamina B₉ (Ac. Fólico), 0.7 (SIGMA); Vehículo (harina de sorgo), 6720; ^m ICN, 65 %; ⁿ Stay-C 35 %, Roche; ^o ICN.

6.3.2.2. Elaboración

Los alimentos se elaboraron en las instalaciones de la Planta de Alimentos Experimentales del CIBNOR, de acuerdo con el protocolo de fabricación de Martínez-Brown (2007). El procedimiento fue el siguiente: primero las harinas se tamizaron a 250 µm y se almacenaron en bolsas de plástico dentro de una cubeta sellada en un cuarto frío a -4 °C, hasta la elaboración de los alimentos experimentales.

Posteriormente, los ingredientes se pesaron de acuerdo a las cantidades calculadas a partir de la formulación. Los macro ingredientes y lípidos se pesaron en una balanza industrial Sartorius BP34000-P, los micro ingredientes y BHT se pesaron en una balanza analítica Ohaus Explorer, EORV70. A continuación, se hizo la mezcla de los macro ingredientes (premezcla 1) en una mezcladora vertical con capacidad

de 20 kg y 1 hp, (Thunderbird, ARM-30). Luego, en un tazón, se realizó la mezcla de los micro ingredientes (premezcla 2) con una espátula. Se agregaron tres cucharadas de la premezcla 1 en la premezcla 2 y se homogeneizaron. Después se incorporó la premezcla 2 a la premezcla 1 y se mezclaron durante 8 minutos.

Posteriormente, se realizó una emulsión con los macro ingredientes líquidos y el BHT (premezcla 3). Enseguida, se integró poco a poco la premezcla 3 a la mezcla de los ingredientes sólidos a una velocidad de mezclado intermedia hasta no observar grumos o residuos de premezcla 3 en las paletas y paredes de la mezcladora.

Una vez incorporados los ingredientes de manera homogénea, se agregó poco a poco agua a temperatura ambiente, mientras se mezclaba a velocidad intermedia durante 3 min o hasta observar una masa homogénea con textura adecuada (puños que no se desmoronan, con consistencia arcillosa).

Se tomaron cantidades de mezcla del tamaño del puño y se colocaron en la charola de un molino de carne. Se pasaron los puños de mezcla por un molino (TORREY 05-01259, cedazo 9 mm), luego se recuperaron y nuevamente se formaron los puños para pasarlos por el molino para homogenizar y dar textura a la masa. Las hebras del alimento, se cortaron con espátula aproximadamente cada 5 cm, conforme salieron del molino. Una vez extruidos, se colocaron en charolas con malla de plástico en el fondo, a secar a 40 °C en un horno de convección (VWR modelo 1680) hasta alcanzar una humedad menor del 10 %, la cual fue monitoreada con una termobalanza (A&D, modelo AD 4713).

6.3.2.3. Empaquetado y almacenado

Los alimentos secos se pesaron en raciones individuales de 4 g. Cada ración se guardó en una bolsa de plástico transparente, la cual se introdujo en una bolsa de plástico negro. Posteriormente, se les inyectó nitrógeno gaseoso (N₂) para evitar la oxidación de los lípidos y con una placa caliente, se sellaron ambas bolsas juntas. Las bolsas se etiquetaron según el alimento y se guardaron en cajas de plástico que se mantuvieron en refrigeración a -4 °C.

6.4. Diseño experimental

Con la finalidad de probar el efecto del nivel de ácido araquidónico en el alimento de reproductores de *Paralabrax maculatofasciatus* sobre la calidad de embriones y larvas, se diseñó un experimento que consistió en 3 etapas, cada una con 1 mes de duración, lapso suficiente para observar el efecto del alimento de los reproductores, sobre la calidad de embriones y larvas, así como obtener un número de evaluaciones suficientes para hacer una comparación estadística (Rosales-Velázquez, 1997; Martínez-Brown, 2007). Como se muestra en la Tabla 3, en la primera etapa se proporcionó como alimento fresco a los reproductores, juveniles de mojarra del género *Eucinostomus* spp. en trozos, para estandarizar su condición nutricional y para tener un punto de referencia de la calidad de los embriones y larvas, ya que éste se ha utilizado en trabajos anteriores con reproductores de esta especie y se ha observado que con este alimento fresco se obtiene una mejor calidad de embriones y larvas (Rosales-Velázquez, 1997; Martínez-Brown, 2007).

En la segunda y tercera etapas se suministraron, por triplicado, 4 alimentos experimentales con diferente nivel de ácido araquidónico (1: 0.17 %, 2: 0.39 %, 3: 0.68 %, 4: 0.26 %) en cada uno de los seis tanques, de manera que cada alimento estuviera presente en la segunda etapa y fuera rotado por otro alimento con diferente composición en la tercera etapa.

Tabla 3. Diseño experimental para determinar el efecto del nivel de ácido araquidónico en el alimento de reproductores de *Paralabrax maculatofasciatus*, sobre la calidad de embriones y larvas.

Etapa	Tanque					
	1	2	3	4	5	6
I	Mojarra	Mojarra	Mojarra	Mojarra	Mojarra	Mojarra
II	2	3	1	4	2	1
III	4	1	4	2	3	3

6.4.1. Condiciones experimentales y mantenimiento de reproductores

Durante los períodos de acondicionamiento al cautiverio y el período experimental, se mantuvieron las mismas condiciones ambientales del SCID y la misma rutina de mantenimiento de reproductores.

La temperatura del agua del SCID se mantuvo a 21.3 ± 0.6 °C y un fotoperíodo de 13 h luz y 11 h oscuridad, condiciones necesarias para inducir a la reproducción a *Paralabrax maculatofasciatus* en cautiverio (Rosales-Velazquez *et al.*, 1992). La alimentación de los reproductores se realizó entre las 10:00 y 11:00 horas. El alimento se proporcionó a saciedad aparente, proporcionando pequeñas cantidades de alimento hasta observar que ya no lo ingirieron, o quedaba en el fondo del tanque; después de 15 a 20 min de suministrar el alimento, se realizó la limpieza de los tanques con un sifón, con el cual se retiró el alimento no consumido y las heces. Durante la limpieza se realizó un recambio de 10 a 20 % del volumen total del agua del SCID. Una vez finalizadas las actividades de alimentación y mantenimiento de reproductores, se procuró no ingresar al sistema para evitar estresar o interrumpir a los peces durante el cortejo. Los peces desovaron prácticamente diario entre las 16:00 y 20:00 h, tiempo durante el cual se monitoreo la presencia de desoves. Una vez que se apagaron las luces a las 20:00 horas, se colocaron los aereadores en cada tanque. Una vez por semana se realizó la limpieza del fondo y paredes de los tanques con una esponja y se realizó un recambio de agua del 50 % del volumen de cada tanque.

6.5. Criterios de calidad

6.5.1. Parámetros reproductivos

6.5.1.1. Fecundidad parcial

Diariamente, se determinó la fecundidad (número de embriones) y la fracción de embriones vivos por tanque, con un método volumétrico (Rosales-Velázquez *et al.*, 1997) que consistió en tomar de las canastas de recolección, los huevos y verterlos en una probeta de 100 ml. Inmediatamente, se aforó a 100 ml con agua de mar (35 ‰, 21 °C) y se vigiló la separación de embriones vivos (fracción flotante) de

los muertos (fracción precipitada). El volumen (ml) que ocupó la fracción flotante, se registró cuando éste alcanzó su valor mínimo. El número de embriones de ambas fracciones se determinó multiplicando el volumen de la fracción correspondiente con el factor de conversión de 1,867, el cual corresponde al número de embriones contenidos en 1 ml (Rosales-Velázquez, 1997). La fecundidad parcial se determinó con la relación:

$$FP = EV + EM$$

En donde: FP = fecundidad parcial; EV = embriones vivos; EM = embriones muertos

6.5.1.2. Viabilidad

La fracción de embriones vivos (viabilidad) se expresó como un porcentaje de la fecundidad por tanque.

6.5.2. Parámetros morfológicos

6.5.2.1. Morfología de los blastómeros

Para evaluar la morfología de los blastómeros se verificó diariamente la presencia de embriones en los recolectores del SCID, entre las 16:00 y 20:00 h. Una vez presentes, se tomó de cada recolector una muestra de embriones y se dio seguimiento a la segmentación con un microscopio estereoscópico (Carl Zeiss). Al alcanzar el estadio de segmentación de 8 células, se tomó una muestra de los embriones. Los embriones se transportaron en recipientes de 5 ml a las instalaciones de la Unidad Piloto de Maricultura (UPIMA) y se colocaron en una placa de Mazzini para tomarles imágenes. Las imágenes se tomaron con ayuda de una cámara digital (HITACHI, modelo KP-D50) conectada a un microscopio estereoscópico (Olympus, modelo SZ40) a un aumento de 4x y el programa de digitalización de imágenes Image-Pro Plus® v. 4.1. Las imágenes obtenidas fueron utilizadas para determinar la morfología de los blastómeros de cada embrión con una escala de 1 a 4, en donde 1 corresponde a un estado deforme, 2 a subregular, 3 a regular y 4 a normal, para los criterios de simetría celular (en el patrón de división), tamaño celular (uniformidad del tamaño celular), adhesión celular (contacto de las membranas), márgenes (resolución de las membranas) e inclusiones (vacuolas) en los blastómeros, de acuerdo con Shields *et al.* (1997). Para determinar la morfología de los blastómeros

(valor de forma) del lote de embriones de cada desove, se sumaron los valores de cada criterio morfológico de cada embrión y se dividieron entre el número de embriones analizados por lote (Mazorra *et al.*, 2003), de acuerdo con la fórmula:

$$VF = \frac{\sum_{i=1}^k s + t + m + i + a}{n}$$

En donde: VF = valor de forma de los blastómeros; s = simetría; a = adhesión; t = tamaño; m = márgenes; i = inclusiones; n = número de embriones analizados por lote

6.5.3. Índices zootécnicos

6.5.3.1. Tasas de eclosión, sobrevivencia larvaria y sobrevivencia a la inanición

El método de incubación utilizado para evaluar la calidad de embriones y larvas mediante los criterios de tasa de eclosión, sobrevivencia larvaria y sobrevivencia a la inanición, fue establecido previamente mediante un experimento, siguiendo las recomendaciones propuestas por Martínez-Brown (2007). En este experimento, se compararon los resultados de criterios de calidad anteriormente mencionados, obtenidos por el método utilizado por Martínez-Brown (2007) y el método de microplacas propuesto por Carrillo *et al.* (2000), Panini *et al.* (2001) y Unuma *et al.* (2005). Los resultados no presentaron diferencias significativas entre ambos métodos, pero sí una tendencia a una mayor sobrevivencia con la técnica de microplacas, como lo confirmaron Carrillo *et al.* (2000) en un experimento similar. El método de incubación en microplacas demostró ser práctico y presentó la ventaja de no afectar la sobrevivencia, ya que se evita la manipulación directa de los organismos y permite hacer un seguimiento individual del desarrollo, desde el embrión hasta la muerte por inanición, por lo que se optó por aplicar este método en el presente estudio.

El método consiste en utilizar como unidad de incubación placas de 96 pozos para cultivos celulares, estériles con fondo en “U” y con tapa de baja evaporación (Falcon, Becton Dickinson Labware, USA). En cada pozo se colocó, con un gotero de plástico, un embrión y posteriormente se agregaron 200 µl de agua de mar filtrada (10 µm) y esterilizada con radiación UV (2 unidades VECTON 25 W, Tropical Marine Centre). Las placas con los embriones se mantuvieron en una incubadora de acrílico

transparente que cuenta con tres niveles para colocar las placas y en la parte inferior dos recipientes con agua, cada uno con un calentador automático sumergible (Visi-Therm, modelo VTN 300, 300 W, Aquarium-System) para mantener una temperatura de incubación de 23 ± 0.5 °C y humedad a punto de rocío para evitar la evaporación del agua de las placas.

La tasa de eclosión se evaluó a las 24 h después del desove y se determinó por medio de la relación:

$$TE = [(EI)(100)]/Em$$

En donde: TE = tasa de eclosión; EI = número de eleuteroembriones; Em = número de embriones sembrados

La tasa de sobrevivencia larvaria se evaluó a partir de la absorción del vitelo, a las 72 h y se calculó con la siguiente fórmula:

$$SL = [(Lv)(100)]/Lt$$

En donde: SL = tasa de transición larvaria; Lv = número de larvas vivas; Lt = número total de larvas (vivas + muertas)

La tasa de sobrevivencia larvaria a la inanición se determinó después de la determinación de la sobrevivencia larvaria, cada 24 h hasta que todas las larvas murieron por el efecto de la inanición y se calculó con la siguiente fórmula, para cada momento de determinación:

$$SI = [(Lv)(100)]/Em$$

En donde: SI = tasa de sobrevivencia de larvas a la inanición; Lv = Número de larvas vivas; Em = Número de embriones sembrados

6.5.3.2. Sobrevivencia al estrés hiperosmótico agudo

La prueba de estrés hiperosmótico agudo se llevó a cabo de acuerdo con los resultados obtenidos por Rodríguez-Trejo *et al.* (datos no publicados) en un estudio previo, realizado para determinar la concentración letal media (LC50) de salinidad, por medio de la determinación de la sobrevivencia de apterolarvas de *Paralabrax maculatofasciatus* sometidas a diferentes salinidades y tiempos de exposición.

Para realizar esta prueba se utilizaron microplacas de 48 pozos, en las cuales se sembraron embriones del mismo desove utilizado para la evaluación de los

índices zootécnicos mencionados anteriormente. El procedimiento para la siembra e incubación de embriones fue el mismo que el utilizado con las placas de 96 pozos (Fig. 3). La prueba de estrés hiperosmótico agudo se realizó al término de la absorción del vitelo (72 horas a partir del desove), para lo cual se determinó previamente la sobrevivencia de las larvas, y posteriormente se aplicó, en cada pozo de 500 μ l, una alícuota de una solución salina al 100 %, preparada con sal de mar artificial (Ocean Instant[®]), con la que se alcanzó una salinidad de 73 ‰. A partir de haber agregado la solución de salmuera al primer pozo, se dio 30 minutos de exposición, después de los cuales se contaron las larvas vivas para determinar la sobrevivencia larvaria al estrés hiperosmótico agudo con la relación:

$$SLEO = [(Lvf)100] / Lvi$$

En donde: SLEO = sobrevivencia larvaria al estrés osmótico; Lvf = larvas vivas al final de la exposición; Lvi = larvas vivas al inicio de la prueba de estrés.

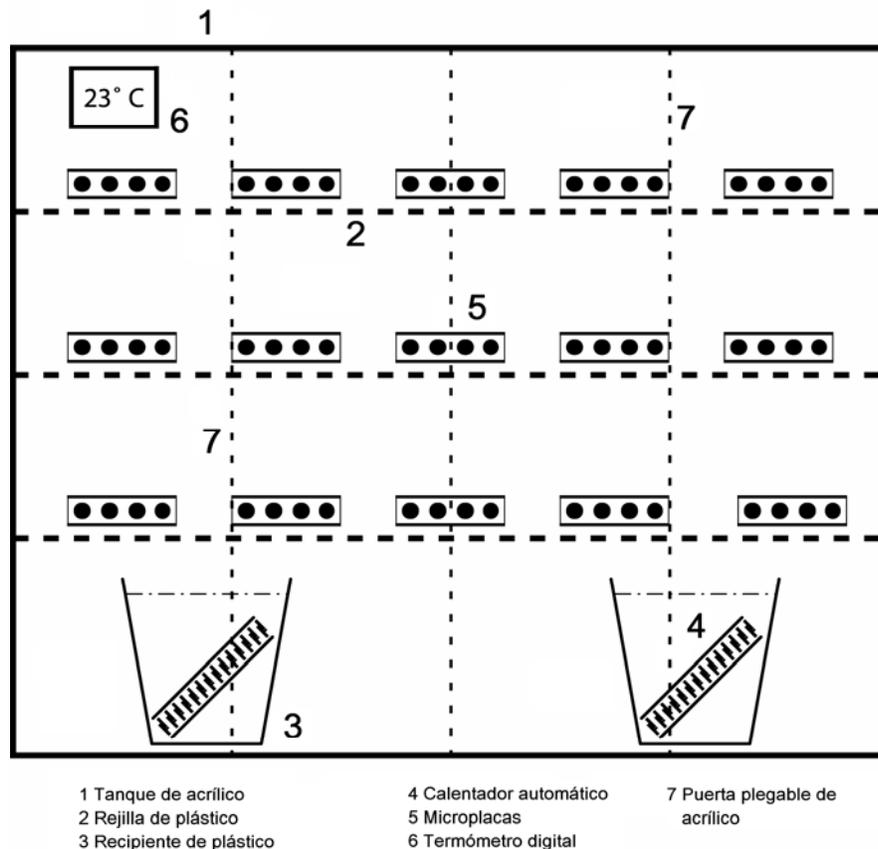


Fig. 3. Esquema de la incubadora utilizada para la evaluación de la calidad de embriones y larvas de *Paralabrax maculatofasciatus*, obtenidas de reproductores alimentados con los alimentos experimentales y fresco.

6.5.4. Composición de ácidos grasos de los embriones

La fracción sobrante de los embriones que se utilizaron para realizar las pruebas de calidad, se concentraron con un tamiz de 300 μm y se enjuagaron con agua destilada, para posteriormente secarse con papel secante por adsorción a través de la malla del tamiz, colocarlos en bolsas de plástico, etiquetarlos, y almacenarlos en un ultracongelador (Thermo[®] mod. 703) hasta su análisis de ácidos grasos, de acuerdo con el método de transesterificación directa descrito en la sección 5.6.3.3.

6.6. Técnicas analíticas

6.6.1. Calidad del agua

Desde el comienzo del período de cuarentena y durante el transcurso del experimento, se monitoreó la calidad de agua del SCID. La determinación de la temperatura ($^{\circ}\text{C} \pm 0.001$), oxígeno disuelto ($\text{mg/l} \pm 0.001$) y salinidad ($\text{‰} \pm 0.001$), se realizó diario *in situ* mediante un equipo multiparámetros (YSI, modelo 556 MPS). La determinación del amonio (NH_4^+ , $\text{mg/l} \pm 0.01$) y nitritos (NO_2 , $\text{mg/l} \pm 0.001$) se realizó una vez a la semana, en el Laboratorio de Química Marina del CICIMAR-IPN. Las muestras de agua se tomaron del drenaje de cada tanque del SCID, antes de suministrar el alimento a los reproductores y las determinaciones se efectuaron por medio de métodos colorimétricos (Strickland y Parsons, 1972), con el uso de un espectrofotómetro (SPECTRONIC, modelo Genesys 2).

La carga de bacterias heterótrofas y hongos del SCID se determinó cada semana, en el Laboratorio de Diagnóstico Microbiológico del CIBNOR. Las muestras se tomaron del tanque de recolección de embriones, con bolsas estériles. Las bacterias heterotróficas (UFC/ml) se determinaron por medio de la cuenta de colonias en superficie, por inoculación por dispersión en Agar 2216, a las 48 horas de incubación, a 37°C . Los hongos (UFC/ml) se determinaron mediante la cuenta de colonias por inoculación en vaciado en placa con Agar Sabouraud, a los 5 días de incubación a temperatura ambiente.

6.6.2. Análisis químico de la composición

Los análisis se llevaron a cabo en el Laboratorio de Bromatología del CIBNOR, de acuerdo con la AOAC (1995). La composición química proximal se determinó por triplicado a los macro ingredientes secos y alimentos experimentales terminados. La humedad (%) se determinó por diferencia de peso a 70 °C/24 h; el contenido de proteína (%) se determinó por el método de microkjeldahl (% N x 6.25); el de extracto etéreo (%), mediante el método Soxtec-Avanti, TECATOR; el contenido de cenizas por diferencia de peso al calcinar a 500 °C/24 h; el contenido de fibra cruda con el método de hidrólisis sucesiva (ácido/base) y el contenido de energía por calorimetría.

6.6.3. Análisis de ácidos grasos

Los análisis de lípidos totales y ácidos grasos se realizaron en las instalaciones del Laboratorio de Biotecnología de Microalgas del CIBNOR. La determinación se efectuó a los macro ingredientes secos y líquidos de los alimentos experimentales, alimento fresco (mojarra), alimentos experimentales terminados y embriones. Todas las muestras analizadas, con excepción de los ingredientes líquidos, fueron liofilizadas previamente a -50 °C y 0.180 mb durante 24 h (liofilizador LABCONCO, modelo 77520-J) y posteriormente congeladas a -80 °C (ultracongelador).

6.6.3.1. Extracción de lípidos totales

La extracción de lípidos totales se realizó mediante la técnica de Blight y Dyer (1959), modificada para muestras pequeñas por Carrasco-Chávez (2004). Para esto, se pesaron 100 mg de muestra en tubos de ensayo con rosca, en una balanza analítica. A cada tubo se le agregaron 3 ml de una mezcla cloroformo-metanol (1:2 v/v) y 10 µl de una solución de BHT al 1 %. Los tubos se taparon en atmósfera de N₂ y se envolvió cinta teflón alrededor del tapón y la rosca del tubo. Se dejaron reposar por 12 h a -50 °C. Posteriormente, se extrajo la fase líquida con una pipeta Pasteur y se trasvasó a un tubo de ensayo limpio. Luego, se realizaron dos lavados a la fase sólida, cada uno con 0.5 ml de cloroformo, centrifugando cada lavado, para

posteriormente extraer la fase líquida y trasvasarla a un segundo tubo de ensayo. Enseguida, se le agregaron 1.8 ml de agua destilada, se mezcló con un mezclador eléctrico y se centrifugó durante 10 min a 3,500 rpm. A continuación, el precipitado (fase líquida inferior de cloroformo) se trasvasó a viales previamente pesados, para posteriormente evaporar el cloroformo con una corriente de N₂ y pesar los extractos secos con una balanza analítica, con el objeto de determinar el contenido de lípidos totales con la siguiente relación:

$$LT = (PV + LT) - PV$$

En donde: LT = lípidos totales; PV = peso del vial

6.6.3.2. Extracción de ácidos grasos totales

6.6.3.2.1. Metanolisis ácida

Los ácidos grasos se esterificaron a partir de la fracción de lípidos totales mediante el método propuesto por Sato y Murata (1988). Los extractos secos contenidos en los viales se resuspendieron con unas gotas de hexano y se trasvasaron a un tubo de ensayo, en donde nuevamente el hexano se evaporó mediante una corriente de nitrógeno. A cada tubo de ensayo se le agregaron 2.5 ml de una solución de metanol (MeOH) y ácido clorhídrico (HCl) (95:5 v/v), se cerraron con tapón y cinta de teflón y se colocaron en un baño María a 85 °C por 2.5 h. Se dejaron enfriar a temperatura ambiente, se agregó 1 ml de hexano, se mezcló con un mezclador eléctrico y se agregaron 2 ml de agua destilada. Posteriormente, con una pipeta Pasteur se separó el sobrenadante y se trasvasó a un vial previamente pesado, en el cual se evaporó el hexano con una corriente de nitrógeno. El vial con el extracto seco de AGME se pesó en una balanza analítica y se calculó el contenido de ácidos grasos totales (AGT) mediante la siguiente ecuación:

$$AGT = PVAG - PV$$

En donde: AGT = ácidos grasos totales; PVAG = peso del vial más ácidos grasos; PV = peso vial solo.

Los extractos secos de AGME se guardaron en atmósfera de nitrógeno, en viales con empaque y sello de teflón, en obscuridad y a -50 °C, hasta su análisis en el cromatógrafo de gases.

6.6.3.2.2. Trans esterificación directa (TED)

A las muestras tomadas de los embriones utilizados en las pruebas de calidad y a las muestras de juveniles de mojarra ofrecidos como alimento a los reproductores, se les extrajeron los ácidos grasos directamente, como ácidos grasos metilo esterificados (AGME), por medio de la técnica de trans esterificación directa (TED) (Carreón-Palau *et al.*, 2007). Para ello, se pesaron en una balanza analítica (A&D HR-60; ± 0.0001) cerca de 50 mg de muestra, la cual se colocó en tubos de ensayo con tapa de rosca y empaque de teflón. A cada tubo de ensayo se le agregó 0.5 ml de una solución de ácido clorhídrico y metanol, a una proporción de 1:2 (v/v). Posteriormente, la tapa de cada tubo de ensayo se selló con cinta teflón y se colocaron, en conjunto, en baño María a 90 °C, por 2 h. A continuación se agregó, a cada tubo de ensayo, 0.5 ml de agua destilada y 2 ml de hexano, y se homogeneizó la mezcla con un mezclador eléctrico, posteriormente se centrifugo durante 10 min a 3,500 rpm. Enseguida, con una pipeta Pasteur el sobrenadante, se trasvasó a un vial de 2 ml, previamente pesado. En los viales, el hexano del extracto se evaporó con una corriente de N₂. El vial con el extracto de AGME seco se pesó en una balanza analítica, para calcular el contenido de ácidos grasos totales (AGT) mediante la siguiente ecuación:

$$AGT = PVAG - PV$$

En donde: AGT = ácidos grasos totales; PVAG = peso del vial más ácidos grasos; PV = peso vial solo.

Los extractos secos de AGME se guardaron en atmósfera de nitrógeno, en viales con empaque y sello de teflón, en obscuridad y a -50 °C, hasta su análisis en el cromatógrafo de gases.

6.6.3.4. Identificación y cuantificación de ácidos grasos

En el vial, al extracto seco de AGME se le agregó 1 ml de hexano y con una jeringa cromatográfica se tomó un alícuota, se colocó en un inserto y se aforó a 250 μ l, con lo que se obtuvo una concentración de 300 μ g. Los insertos se colocaron en viales de inyección y se colocaron en el carrusel del inyector automático del cromatógrafo de gases acoplado a un espectrómetro de masas (GCD Hewlett Packard, modelo G1800B). La fase estacionaria del cromatógrafo consistió en una película de glicol de polietileno de 0.25 μ m de espesor, adherida a la superficie interna de una columna capilar de sílice fundida (DB 23 Agilent) de 60 m de longitud y 0.25 mm de diámetro interno. La fase móvil consistió en helio a un flujo de 0.5 ml/min. Las condiciones de trabajo fueron: La temperatura del inyector y del detector fue de 250 °C. La temperatura inicial fue de 110 °C y se mantuvo por 3 min, posteriormente se incrementó a una tasa de 3 °C/min hasta alcanzar los 165 °C, en donde se mantuvo por 2 min. Después se volvió a incrementar la temperatura a una tasa de 3 °C/min, hasta alcanzar los 210 °C y se estabilizó por 2 min, para a continuación volver a incrementar la temperatura a una tasa de 3 °C/min, hasta llegar a los 240 °C, en donde se mantuvo por 20 min. El rango de masas del detector fue de 45:450 m/z.

La identificación de los ácidos grasos se realizó por medio de la comparación de sus tiempos de retención con los tiempos de retención de estándares de ácidos grasos utilizados para la elaboración de una curva de calibración efectuada al inicio de la puesta en marcha de la columna capilar que se utilizó en este estudio. Así también, para la identificación se compararon los espectros de masas obtenidos, con los contenidos en las bases de datos NIST02, NIST98, NBS75K en el programa GCD Plus ChemStation versión A.01 (Hewlett Packard®).

6.7. Análisis estadístico

Los datos porcentuales se transformaron con la función raíz arco seno. La normalidad y la homoscedasticidad se determinaron a todos los datos, con las pruebas de Kolmogorov-Smirnov y Levene, respectivamente; si cumplieron estos supuestos, se realizó un análisis de varianza de una vía para determinar la existencia de diferencias entre tratamientos ($P < 0.05$). Cuando hubo diferencias, se aplicó la prueba de comparaciones múltiples de Holm-Sidak. A los datos que no se ajustaron a la normalidad y no fueron homoscedásticos se les aplicó una prueba por rangos de Kruskal-Wallis y cuando se hallaron diferencias, se utilizó la prueba de comparaciones múltiples de Duncan (Sokal y Rohlf, 1994; Zar, 1996). Los análisis estadísticos paramétricos se realizaron con el programa de computo SigmaStat[®] v. 3.0 (SPSS, Inc.) y los no paramétricos con Statistica[®] v. 6.0 (StatSoft, Inc).

7. Resultados

7.1. Condiciones experimentales

7.1.1. Calidad del agua del SCID

Los valores promedio de los parámetros de calidad del agua evaluados durante el desarrollo del experimento, no mostraron diferencias significativas entre los seis tanques que conforman al SCID (Tabla 4). La concentración promedio (mg/l) de amonio (NH_4^+) y nitritos (NO_2^-) se mantuvieron en todos los tanques, dentro de los niveles aceptables para el cultivo de peces marinos ($<1 \text{ mg NH}_4^+\text{-N/l}$; $<10 \text{ mg NO}_2^-\text{-N/l}$; Tucker, 1998). La temperatura ($^\circ\text{C}$) promedio se mantuvo estable entre los 20.5 y 21.5 $^\circ\text{C}$. La concentración de oxígeno se mantuvo entre los 5.6 a 5.9 mg/l. La salinidad promedio se mantuvo en $35 \pm 0.7 \text{ ‰}$.

Tabla 4. Parámetros de calidad del agua del Sistema Cerrado de Inducción al Desove durante el periodo experimental

Tanque	Amonio (mg $\text{NH}_4^+\text{-N/l}$)	Nitritos (mg $\text{NO}_2^-\text{-N/l}$)	Temperatura ($^\circ\text{C}$)	Oxígeno (mg/l)	Salinidad (‰)
1	0.17 ± 0.19	0.019 ± 0.018	21.4 ± 0.6	5.9 ± 0.9	35.4 ± 0.8
2	0.15 ± 0.10	0.019 ± 0.019	21.3 ± 0.6	5.9 ± 0.9	35.4 ± 0.8
3	0.17 ± 0.11	0.019 ± 0.019	21.4 ± 0.6	5.7 ± 0.8	35.4 ± 0.8
4	0.14 ± 0.12	0.020 ± 0.019	21.3 ± 0.6	5.6 ± 0.7	35.5 ± 0.6
5	0.14 ± 0.10	0.020 ± 0.018	21.2 ± 0.7	5.8 ± 0.8	35.6 ± 0.5
6	0.16 ± 0.11	0.020 ± 0.018	21.4 ± 0.6	5.7 ± 0.9	35.4 ± 0.8

Los valores representan el promedio \pm la desviación estándar; no se encontraron diferencias significativas entre tanques ($P > 0.05$).

7.1.2. Biometría de reproductores

Los valores promedio de longitud patrón (cm) y peso (g) de los reproductores de *Paralabrax maculatofasciatus*, al inicio del experimento, no presentaron diferencias significativas entre los tanques, por sexo. La biometría final indicó un incremento homogéneo en longitud y peso, tanto en hembras como en machos, ya que no se presentaron diferencias significativas entre tanques (Tabla 5).

Tabla 5. Longitud patrón (cm) y peso (g) de reproductores de *Paralabrax maculatofasciatus* al inicio y al final del periodo experimental.

	Tanque					
	1	2	3	4	5	6
Inicio						
Longitud patrón (cm)						
♂ (n=4)	19.8 ± 1.8	17.6 ± 2.6	18.5 ± 2.4	18.0 ± 2.7	18.7 ± 2.7	19.0 ± 1.8
♀ (n=6)	18.8 ± 2.4	19.3 ± 1.5	19.2 ± 2.0	19.6 ± 1.3	17.9 ± 0.6	18.9 ± 1.7
Peso (g)						
♂ (n=4)	212.8 ± 61.2	150.5 ± 73.9	171.8 ± 75.7	156.0 ± 74.9	166.5 ± 64.3	180.3 ± 50.7
♀ (n=6)	179.7 ± 70.1	190.3 ± 40.3	177.3 ± 49.0	189.3 ± 35.0	142.5 ± 17.9	162.0 ± 41.0
Final						
Longitud patrón (cm)						
♂ (n=4)	21.6 ± 2.1	20.7 ± 2.2	21.9 ± 3.0	20.8 ± 2.8	21.4 ± 2.9	20.6 ± 1.7
♀ (n=6)	21.2 ± 1.8	21.1 ± 1.9	21.2 ± 3.3	21.1 ± 2.4	20.8 ± 2.0	20.9 ± 1.3
Peso (g)						
♂ (n=4)	303.9 ± 94.4	278.8 ± 82.3	313.5 ± 122.8	289.1 ± 96.0	298.7 ± 101.5	274.3 ± 60.9
♀ (n=6)	289.6 ± 85.3	293.3 ± 69.9	282.9 ± 114.4	305.3 ± 81.2	283.8 ± 68.1	293.3 ± 63.1

Los valores representan el promedio ± la desviación estándar; no se encontraron diferencias significativas entre tanques ($P > 0.05$).

7.1.3. Alimentos

7.1.3.1. Composición química de los alimentos experimentales y del alimento fresco

El análisis de la composición química de los alimentos experimentales (Tabla 6) mostró que el contenido de proteínas fue muy cercano al nivel de formulación (45 %). El nivel de proteína en la mojarra fue mayor (70 %) que el de los alimentos experimentales.

El contenido de lípidos totales en los alimentos experimentales varió entre el 19 y 23 % y fue ligeramente mayor al nivel de formulación (18 %). El nivel de extracto etéreo de la mojarra fue de 3.2 % y fue tomado de los resultados obtenidos de Martínez-Brown (2007).

El contenido de fibra cruda fue mayor en el alimento 3 (7.8 %) con respecto al resto de los alimentos experimentales. Los alimentos 1 y 4, resultaron con un contenido similar (0.4 y 0.2 %, respectivamente) y solo el nivel de fibra cruda en

alimento 2 (2.4 %) fue más cercano al nivel de formulación (1.3 %). No se detectó fibra cruda en la mojarra.

El contenido de cenizas fue similar en todos los alimentos experimentales (12 %) y fue cercano al nivel de formulación (11 %). El contenido de cenizas en la mojarra fue mayor (20.6 %) que el de los alimentos experimentales.

El nivel de energía fue muy similar entre los alimentos 1 y 2 y entre los alimentos 3 y 4, estos últimos con un nivel más cercano al nivel de formulación (3,462 cal/g) y al nivel determinado en la mojarra (4,620 cal/g).

El contenido de humedad de los alimentos experimentales varió entre el 6 y 9 %, y fue mayor en la mojarra (80 %).

Tabla 6. Composición química (%) de los alimentos experimentales y del alimento fresco, utilizados para alimentar a reproductores de *Paralabrax maculatofasciatus*.

	1	2	3	4	Mojarra ϕ
Proteína cruda	47.0 ± 0.1	47.2 ± 0.1	48.1 ± 0.2	46.8 ± 0.2	69.9 ± 0.1
Lípidos totales	22 ± 1.0	19 ± 0.5	20 ± 1.4	23 ± 0.0	
Extracto etéreo					3.2 ± 0.1
Fibra cruda	0.4 ± 0.0	2.4 ± 0.2	7.8 ± 0.1	0.2 ± 0.1	N.D.
Cenizas	12.5 ± 0.0	12.7 ± 0.1	12.5 ± 0.2	12.7 ± 0.1	20.6 ± 0.2
Energía Y	5,021 ± 2.4	5,071 ± 25.1	4,031 ± 7.2	3,808 ± 13.7	4,620
Humedad X	7.6 ± 0.1	9.3 ± 0.1	8.1 ± 0.1	6.1 ± 0.1	80.2 ± 0.2

Los valores representan la media ± la desviación estándar (n = 3). N.D., significa no detectado. X indica determinación en base húmeda. Y indica Cal/g. ϕ valores obtenidos de Martínez-Brown (2007). ELN, es extracto libre de nitrógeno.

7.1.3.2. Composición de ácidos grasos de los alimentos experimentales y del alimento fresco

El análisis de la composición de ácidos grasos mostró 22 ácidos grasos detectados en los alimentos experimentales y 27 en la mojarra y fueron expresados en % de materia seca (Tabla 7). Los ácidos grasos se agruparon de acuerdo con el número de enlaces dobles, familia a la que pertenecen y su función fisiológica conocida, para una mejor comparación entre los tratamientos alimentarios.

De acuerdo con esto, el contenido de ácidos grasos saturados (AGS) en los alimentos experimentales fue similar (4-5 %) y mayor que el encontrado en la mojarra (1 %).

El contenido de ácidos grasos monoinsaturados (AGMI), fue mayor en el alimento 1 (6.5 %), menor en el alimento 4 (4.3 %) y similar en los alimentos 2 y 3 (5.6 y 5.2 %, respectivamente), mientras que, en la mojarra se presentó el menor contenido (0.7 %), comparado con los alimentos experimentales.

El contenido de ácidos grasos poliinsaturados (AGPI) resultó similar entre los alimentos 1, 2 y 3 (4.8, 5.3 y 5.6 %, respectivamente) y mayor que el del alimento 4 (1.7 %) y la mojarra (2.8 %).

El contenido de ácidos grasos esenciales (AGE) fue ligeramente mayor en los alimentos 2 y 3 (3.4 y 3.9 %, respectivamente) que el del alimento 1 (2.5 %) y la mojarra (2.3 %), sin embargo el contenido de AGE fue menor en el alimento 4 (1 %).

El contenido total de ácidos grasos de la familia (n-6) de los alimentos 1, 2 y 3 fue similar entre sí (1.7, 1.8 y 1.9, respectivamente) y mayor que el del alimento 4 (0.8 %) y la mojarra (0.3 %).

El contenido total de ácidos grasos de la familia (n-3) fue similar en los alimentos 2 y 3 (3.4 y 3.6 %, respectivamente), y en el alimento 1 y la mojarra (2.9 y 2.4, correspondientemente), no obstante fue menor en el alimento 4 (0.8 %).

El contenido de ArA en los alimentos 1, 2 y 3 (0.17, 0.39 y 0.68 %, respectivamente) resultaron similares a sus niveles de formulación (0.14, 0.42 y 0.71 %, correspondientemente). En contraste, el contenido de ArA en el alimento 4 (0.26 %) fue menor que su nivel de formulación (1 %) e igual al de la mojarra (0.26 %).

El contenido de EPA en los alimentos 1, 2 y 3 (0.9, 1 y 1.1 %, respectivamente) fue similar a su nivel de formulación (1 %), a diferencia del contenido de EPA del alimento 4 (0.2 %), que resultó menor a su nivel de formulación (1 %) y similar al nivel de EPA en la mojarra (0.3 %).

El contenido de DHA en el alimento 1 (1.4 %) fue similar a su nivel de formulación (1.5 %) y cercano al de la mojarra (1.7 %). No obstante, el contenido de DHA de los alimentos 2 y 3 (1.9 y 2.2 %, correspondientemente) resultó ligeramente mayor a su nivel de formulación (1.5 %), en contraste con el del alimento 4 (0.5 %), que fue menor a su nivel de formulación (1.5 %).

La razón ArA/EPA en los alimentos 1, 2, 3 y 4 (0.18, 0.38, 0.62 y 0.96, respectivamente) resultó similar a sus valores de formulación (0.14, 0.42, 0.71 y 1, correspondientemente). La razón ArA/EPA en la mojarra fue de 0.78.

La razón DHA/EPA en el alimento 1 (1.5) fue similar a la de su formulación (1.5), y en los alimentos 2, 3 y 4 (1.9, 2 y 1.8) resultó ligeramente mayor a las de sus fórmulas (1.5). La razón DHA/EPA en la mojarra fue de 5.3.

Tabla 7. Composición de ácidos grasos (% de materia seca) de los alimentos experimentales y fresco utilizados para alimentar a peces reproductores de *P. maculatofasciatus*.

Ácido graso	1	2	3	4	Mojarra
14:0	0.87 ± 0.040	0.68 ± 0.019	0.74 ± 0.06	0.69 ± 0.042	0.02 ± 0.003
15:0	0.13 ± 0.006	0.10 ± 0.003	0.10 ± 0.008	0.10 ± 0.006	0.02 ± 0.003
16:0	2.82 ± 0.130	2.53 ± 0.07	2.64 ± 0.214	2.54 ± 0.153	0.50 ± 0.029
16:0 iso	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	0.02 ± 0.004
17:0	0.16 ± 0.007	0.13 ± 0.004	0.13 ± 0.01	0.14 ± 0.008	0.06 ± 0.006
18:0	0.98 ± 0.045	0.93 ± 0.026	1.02 ± 0.082	1.09 ± 0.066	0.38 ± 0.018
19:0	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	0.02 ± 0.004
20:0	0.07 ± 0.003	0.06 ± 0.002	0.05 ± 0.004	0.06 ± 0.004	0.02 ± 0.001
22:0	0.06 ± 0.003	0.04 ± 0.001	0.05 ± 0.004	0.06 ± 0.004	N.D.
15:1 (n-5)	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	Traza
16:1 *	1.06 ± 0.049	0.93 ± 0.026	0.95 ± 0.077	0.80 ± 0.049	N.D.
16:1 14 metilo	0.08 ± 0.004	0.07 ± 0.002	0.07 ± 0.006	0.07 ± 0.004	N.D.
16:1 (n-10) 7 metilo	0.09 ± 0.004	0.06 ± 0.002	0.06 ± 0.005	0.05 ± 0.003	N.D.
16:1 (n-9)	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	0.01 ± 0.003
16:1 (n-7)	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	0.07 ± 0.002
16:1 (n-5)	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	0.03 ± 0.003
17:1 (n-7)	0.08 ± 0.004	0.07 ± 0.002	0.06 ± 0.005	0.06 ± 0.004	0.03 ± 0.001
18:1 (n-9) t	3.73 ± 0.172	3.15 ± 0.086	2.83 ± 0.229	2.27 ± 0.137	0.29 ± 0.010
18:1 (n-9) c	0.87 ± 0.04	0.75 ± 0.021	0.71 ± 0.058	0.60 ± 0.036	0.10 ± 0.000
20:1 (n-9)	0.39 ± 0.018	0.36 ± 0.01	0.34 ± 0.027	0.32 ± 0.02	0.03 ± 0.006
22:1 *	0.25 ± 0.012	0.21 ± 0.006	0.22 ± 0.018	0.21 ± 0.013	N.D.
24:1 (n-9)	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	0.22 ± 0.017
16:2 (n-4)	0.10 ± 0.004	0.06 ± 0.002	0.06 ± 0.005	0.03 ± 0.002	N.D.
18:2 (n-6) t	1.62 ± 0.074	1.42 ± 0.039	1.29 ± 0.104	0.60 ± 0.036	0.03 ± 0.002
20:2 (n-6)	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	0.03 ± 0.001
20:3 (n-6)	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	0.03 ± 0.003
20:4 (n-6)	0.17 ± 0.008	0.39 ± 0.011	0.68 ± 0.055	0.26 ± 0.016	0.26 ± 0.000
18:3 (n-3)	0.36 ± 0.017	0.29 ± 0.008	0.23 ± 0.019	0.02 ± 0.001	0.03 ± 0.000
18:4 (n-3)	0.18 ± 0.008	0.15 ± 0.004	0.15 ± 0.012	0.06 ± 0.004	0.02 ± 0.005
20:3 (n-3)	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	0.05 ± 0.021
20:5 (n-3)	0.94 ± 0.043	1.03 ± 0.028	1.09 ± 0.088	0.27 ± 0.016	0.33 ± 0.017
22:5 (n-3)	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	0.29 ± 0.011
22:6 (n-3)	1.49 ± 0.068	1.98 ± 0.054	2.21 ± 0.179	0.49 ± 0.03	1.76 ± 0.151
Σ AGS	5.09 ± 0.23	4.46 ± 0.12	4.72 ± 0.38	4.68 ± 0.28	1.05 ± 0.070
Σ AGMI	6.55 ± 0.30	5.60 ± 0.15	5.25 ± 0.42	4.38 ± 0.26	0.77 ± 0.030
Σ AGPI	4.85 ± 0.22	5.32 ± 0.15	5.69 ± 0.46	1.73 ± 0.10	2.83 ± 0.160
Σ AGE	2.59 ± 0.12	3.40 ± 0.09	3.97 ± 0.32	1.02 ± 0.06	2.35 ± 0.170
Σ (n-6)	1.78 ± 0.08	1.81 ± 0.05	1.96 ± 0.16	0.86 ± 0.05	0.35 ± 0.000
Σ (n-3)	2.97 ± 0.14	3.44 ± 0.09	3.68 ± 0.3	0.85 ± 0.05	2.48 ± 0.150
ARA/EPA	0.18	0.38	0.62	0.96	0.78
DHA/EPA	1.58	1.93	2.03	1.83	5.39

Los valores representan la media ± la desviación estándar (n=3). N.D., es no detectado. Trazas < 0.01. * indica que la familia de ácido graso no pudo ser identificada.

7.2. Criterios de calidad

7.2.1. Parámetros reproductivos

7.2.1.1. Fecundidad

El promedio de la fecundidad parcial de reproductores alimentados con el alimento 1 fue significativamente mayor (66,074 ovocitos/desove) que los obtenidos con el resto de los alimentos experimentales y el fresco. Los promedios de la fecundidad parcial de reproductores alimentados con el alimento 2, el alimento 3 y con la mojarra, no presentaron diferencias entre sí (49,538, 43,861 y 34,391, respectivamente). El promedio de la fecundidad parcial de reproductores alimentados con el alimento 4 fue significativamente menor (20,185) que los obtenidos de reproductores alimentados con el resto de los alimentos experimentales, sin embargo no presentó diferencias significativas con el promedio de fecundidad parcial de reproductores alimentados con mojarra (Tabla 8).

7.2.1.2. Viabilidad

El promedio de la viabilidad (% de embriones vivos) de los embriones obtenidos de reproductores alimentados con mojarra fue significativamente mayor (78 %) que el de los obtenidos de reproductores alimentados con los alimentos experimentales. Los promedios de viabilidad de embriones obtenidos de reproductores alimentados con los alimentos 1 y 4, no presentaron diferencias entre ellos (44.9 y 38.1 %), pero fueron significativamente mayores que los obtenidos de reproductores alimentados con los alimentos 2 y 3 (21.7 y 19.8 %), los cuales no presentaron diferencias significativas entre sí (Tabla 8).

Tabla 8. Fecundidad parcial (número de huevos) y viabilidad (% de embriones vivos en fase de embrión) obtenidas de reproductores de *Paralabrax maculatofasciatus* alimentados con los alimentos experimentales y el alimento fresco.

Parámetro	1	2	3	4	Mojarra
Fecundidad parcial	66,074 ± 56469a	49,538 ± 47808b	43,861 ± 39859b	20,185 ± 21570c	34,391 ± 39181bc
Viabilidad	44.9 ± 30.0b	21.7 ± 25.4c	19.8 ± 23.8c	38.1 ± 30.1b	78.8 ± 25.3a

Los valores representan el promedio ± la desviación estándar. Literales diferentes entre columnas indican diferencias significativas ($P < 0.05$).

7.2.2. Parámetros morfológicos

7.2.2.1. Morfología de los blastómeros

El promedio del valor de la morfología de los blastómeros de embriones en fase de segmentación obtenidos a partir de reproductores alimentados con mojarra (Fig. 4), no presentó diferencias significativas con el promedio obtenido a partir del alimento 1 (17.8 y 17.6, respectivamente), no obstante, resultó significativamente mayor a los obtenidos con el resto de los alimentos experimentales. A su vez, el promedio del valor de forma de los blastómeros de embriones obtenidos de reproductores alimentados con el alimento 1 no presentó diferencias significativas con el promedio obtenido a partir del alimento 2 (17) y fue significativamente mayor que los promedios obtenidos con los alimentos experimentales restantes. El promedio del valor de forma de los blastómeros de embriones obtenidos de reproductores alimentados con el alimento 2 no presentó diferencias significativas con el promedio obtenido a partir del alimento 4 (16.3), ambos fueron mayores que el promedio del valor de forma de los blastómeros de embriones obtenidos de reproductores alimentados con el alimento 3 (15.3).

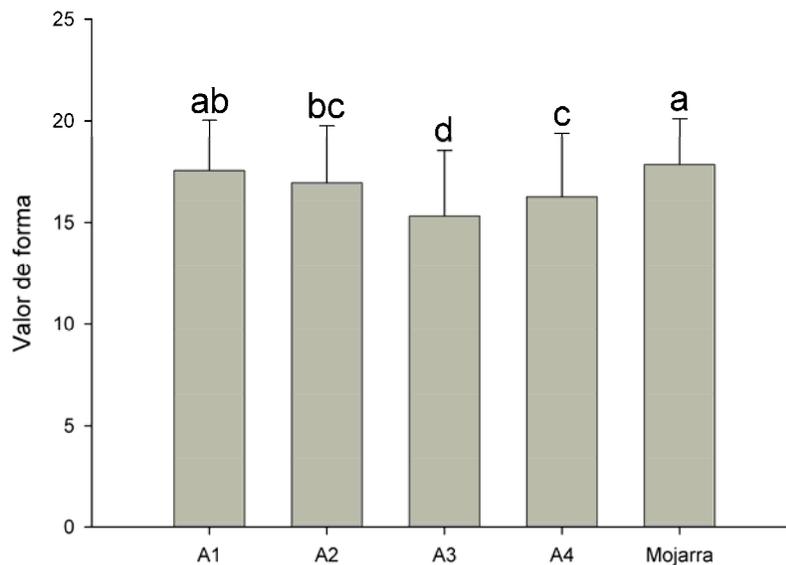


Figura 4. Valor de forma de los blastómeros de embriones en fase de segmentación obtenidos de reproductores de *Paralabrax maculatofasciatus* alimentados con los alimentos experimentales y el alimento fresco. Las barras representan el promedio y el bigote, la desviación estándar.

7.2.3. Índices zootécnicos

7.2.3.1. Tasa de eclosión

El promedio de la tasa de eclosión (%) (Tabla 9) de los embriones obtenidos de reproductores alimentados con los alimentos experimentales (95-99 %) y fresco (97 %) no presentaron diferencias significativas entre sí.

7.2.3.2. Supervivencia larvaria

El promedio de la supervivencia larvaria (%) (Tabla 9) de larvas obtenidas de reproductores alimentados con los cuatro alimentos experimentales (64-90 %) y la mojarra (80 %) no presentaron diferencias significativas entre si.

7.2.3.3. Supervivencia larvaria al estrés hiperosmótico agudo

El promedio de la supervivencia larvaria al estrés hiperosmótico agudo (%) (Tabla 9) de las larvas obtenidas de reproductores alimentados con los cuatro alimentos experimentales (49-75 %) y mojarra (66 %) no presentaron diferencias significativas entre sí.

7.2.3.4. Supervivencia larvaria a la inanición

El promedio de la supervivencia larvaria a la inanición (%) (Tabla 9) en el tiempo 1 (96 h) no presentó diferencias significativas entre las larvas obtenidas de los reproductores alimentados con los cuatro alimentos experimentales (46-89 %) y mojarra (77 %). Sin embargo, para el tiempo 2 (129 h), el promedio de la supervivencia de larvas obtenidas de reproductores alimentados con el alimento 4 (37 %), no presentó diferencias significativas con el promedio obtenido a partir del alimento 2 (17.5 %), pero fue significativamente mas alto que los obtenidos con el resto de los alimentos experimentales. El promedio de la supervivencia de larvas obtenidas de reproductores alimentados con los alimentos experimentales 1, 2 y 3 (6.3, 17.5 y 0.2 %, respectivamente) y la mojarra (8.4 %), no presentaron diferencias significativas entre sí. Por otra parte, para el tiempo 3 de inanición no se presentaron diferencias significativas entre los promedios de supervivencia de larvas obtenidas de

reproductores alimentados con mojarra (0.03 %) y el promedio de las obtenidas con los alimentos experimentales (0 %).

Tabla 9. Índices zootécnicos de embriones y larvas de *Paralabrax maculatofasciatus*, obtenidos de reproductores alimentados con los alimentos experimentales y el alimento fresco.

	1	2	3	4	Mojarra
Tasa de eclosión	95.2 ± 4.3	95.8 ± 2.3	95.4 ± 1.6	99.4 ± 0.4	97.4 ± 3.9
Supervivencia larvaria	71.0 ± 17.1	84.7 ± 5.8	63.9 ± 29.4	89.7 ± 9.0	80.1 ± 16.7
Supervivencia al estrés osmótico	75.3 ± 7.0	48.8 ± 6.1	67.1 ± 22.6	67.3 ± 17.3	66.0 ± 20.1
Inanición tiempo 1	45.8 ± 35.2	88.9 ± 4.0	71.8 ± 13.5	80.4 ± 16.1	76.5 ± 28.7
Inanición tiempo 2	6.30 ± 14.1b	17.5 ± 13.8ab	0.20 ± 0.3b	37.4 ± 17.4a	8.40 ± 11.8b
Inanición tiempo 3	0.00 ± 0.0	0.00 ± 0.0	0.00 ± 0.0	0.00 ± 0.0	0.03 ± 0.1

Los valores representan la media ± la desviación estándar. Literales diferentes entre columnas indican diferencias significativas ($P < 0.05$).

7.2.4. Composición de ácidos grasos de los embriones

Para una mejor exposición y análisis de los resultados de la composición de ácidos grasos de embriones, los ácidos grasos son clasificados de acuerdo con el número de enlaces dobles, familia (de la nomenclatura n) o la función fisiológica conocida.

Los resultados de la composición de ácidos grasos ($\mu\text{g}/\text{embrión}$ en base seca) de embriones en fase de embrión, obtenidos de reproductores alimentados con los alimentos experimentales y el alimento fresco (Tabla 10), exhibieron 27 ácidos grasos de los 33 detectados en los alimentos experimentales y el alimento fresco.

El peso seco promedio de los embriones obtenidos con los alimentos experimentales y fresco no mostró diferencias significativas entre sí (28-30 $\mu\text{g}/\text{embrión}$).

El contenido promedio de ácidos grasos totales (AGT) de los embriones obtenidos con el alimento fresco (4.5 $\mu\text{g}/\text{embrión}$) no mostró diferencias significativas con el encontrado en embriones obtenidos con los alimentos experimentales 1, 2 y 3 (4.1, 4.0 y 4.2 $\mu\text{g}/\text{embrión}$, respectivamente) pero fue estadísticamente mayor que el contenido promedio de AGT de embriones obtenidos con el alimento experimental 4 (3.8 $\mu\text{g}/\text{embrión}$). Los contenidos promedios de AGT de los embriones obtenidos a partir de los alimentos experimentales no mostraron diferencias significativas entre sí.

El contenido promedio de ácidos grasos saturados (AGS) de los embriones obtenidos a partir del alimento fresco fue significativamente mayor (1.2 µg/embrión) que el promedio de los embriones obtenidos con los alimentos experimentales, los cuales no presentaron diferencias significativas entre ellos (0.93 - 0.96 µg/embrión).

El contenido promedio de ácidos grasos monoinsaturados (AGMI) de los embriones obtenidos de reproductores alimentados con el alimento fresco (1.1 µg/embrión) no mostró diferencias significativas con el promedio de embriones obtenidos con el alimento 4 (1 µg/embrión), pero sí con el resto de los alimentos experimentales. Los promedios de AGMI de los embriones obtenidos con los alimentos experimentales no mostraron diferencias entre sí (0.9-1.0 µg/embrión).

El contenido promedio de ácidos grasos poliinsaturados (AGPI) de embriones obtenidos con los alimentos experimentales (1.8-2.3 µg/embrión) y los obtenidos con el alimento fresco (1.1 µg/embrión) no presentaron diferencias estadísticas.

El contenido promedio de ácidos grasos esenciales (AGE) de embriones obtenidos con los alimentos experimentales (1.5-1.8 µg/embrión) y el alimento fresco no mostró diferencias significativas (1.6 µg/embrión).

El contenido de ácidos grasos (n-6) de los embriones obtenidos con el alimento 2 (0.41 µg/embrión) fue significativamente mayor al de los embriones obtenidos con el alimento 4 (0.24 µg/embrión) y con el alimento fresco (0.28 µg/embrión), no obstante no presentó diferencias significativas con los embriones obtenidos con los alimentos 1 y 3 (0.33 y 0.38 µg/embrión, respectivamente), los cuales a su vez no presentaron diferencias con el contenido de los embriones obtenidos con el alimento fresco. El contenido de ácidos grasos (n-6) de embriones obtenidos con el alimento 4 no mostró diferencias estadísticas con el contenido promedio de los embriones obtenidos con el alimento 1 y con el alimento fresco.

El contenido promedio de ácidos grasos (n-3) de los embriones obtenidos con los alimentos experimentales y el fresco no fue diferente.

El contenido promedio de ácido araquidónico (ArA) de embriones obtenidos con el alimento 3 y el alimento fresco (0.20 y 0.19 µg/embrión, respectivamente) fue significativamente mayor que el de los embriones obtenidos con el alimento 1 (0.13 µg/embrión) y no presentó diferencias con los embriones obtenidos con el alimento 2

y 4 (ambos con 0.16 $\mu\text{g}/\text{embrión}$), los cuales a su vez no fueron diferentes estadísticamente con los embriones obtenidos con el alimento 1.

El contenido promedio de EPA de embriones obtenidos con los alimentos 1, 2, 3 y el alimento fresco (0.28, 0.27, 0.27 y 0.23 $\mu\text{g}/\text{embrión}$, correspondientemente), no presentaron diferencias significativas entre sí. El contenido promedio de los embriones obtenidos con el alimento fresco, fue estadísticamente mayor que el de los embriones obtenidos con el alimento 4 (0.19 $\mu\text{g}/\text{embrión}$).

El contenido promedio de DHA de embriones obtenidos con los alimentos experimentales y fresco (1.16-1.37 $\mu\text{g}/\text{embrión}$), no fue significativamente diferente.

La razón promedio ArA/EPA de embriones obtenidos con el alimento 4 y fresco (0.87 y 0.81, respectivamente), no presentaron diferencias significativas con la razón promedio de embriones obtenidos con el alimento 3 (0.74), el cual no presentó diferencias con la razón promedio obtenida con el alimento 2 (0.59), pero fue significativamente mayor que la razón promedio de embriones obtenidos con el alimento 1 (0.47), el que a su vez no presentó diferencias estadísticas con la razón promedio de embriones obtenidos con el alimento 2.

La razón promedio DHA/EPA de embriones obtenidos con los alimentos 1, 2, 3 y fresco (4.6, 4.7, 5 y 5.2, respectivamente) no presentaron diferencias significativas entre sí, pero con excepción de la razón promedio de embriones obtenidos con el alimento fresco, fue estadísticamente menor que la razón promedio de embriones obtenidos con el alimento 4 (6.2).

Tabla 10. Composición de ácidos grasos de embriones ($\mu\text{g}/\text{embrión}$ en base seca) obtenidos de reproductores de *Paralabrax maculatofasciatus* alimentados con alimentos experimentales y alimento fresco.

Ácido graso	1 (n=5)	2 (n=3)	3 (n=3)	4 (n=4)	Mojarra (n=6)
14:0	0.08 ± 0.021	0.08 ± 0.011	0.06 ± 0.004	0.07 ± 0.014	0.12 ± 0.030
15:0	0.01 ± 0.001	0.01 ± 0.002	0.01 ± 0.003	0.01 ± 0.002	0.01 ± 0.001
16:0	0.61 ± 0.079	0.59 ± 0.005	0.61 ± 0.096	0.64 ± 0.072	0.81 ± 0.021
16:0 iso	0.02 ± 0.005	0.02 ± 0.003	0.02 ± 0.001	0.02 ± 0.003	0.02 ± 0.004
17:0	0.03 ± 0.005	0.02 ± 0.003	0.02 ± 0.004	0.02 ± 0.005	0.03 ± 0.003
18:0	0.16 ± 0.011	0.17 ± 0.016	0.18 ± 0.037	0.17 ± 0.029	0.21 ± 0.010
19:0	0.02 ± 0.004	0.02 ± 0.004	0.02 ± 0.001	0.01 ± 0.003	0.02 ± 0.003
20:0	0.02 ± 0.004	0.02 ± 0.003	0.02 ± 0.000	0.01 ± 0.005	0.02 ± 0.003
15:1 (n-5)	Traza	Traza	Traza	Traza	Traza
16:1 (n-9)	0.03 ± 0.010	0.03 ± 0.001	0.04 ± 0.004	0.04 ± 0.007	0.05 ± 0.003
16:1 (n-7)	0.19 ± 0.065	0.15 ± 0.019	0.17 ± 0.061	0.23 ± 0.036	0.30 ± 0.040
16:1 (n-5)	0.02 ± 0.003	0.01 ± 0.002	0.01 ± 0.003	0.01 ± 0.003	0.02 ± 0.002
17:1 (n-7)	0.02 ± 0.005	0.02 ± 0.001	0.02 ± 0.009	0.02 ± 0.004	0.03 ± 0.002
18:1 (n-9) t	0.49 ± 0.061	0.49 ± 0.023	0.44 ± 0.013	0.48 ± 0.063	0.51 ± 0.032
18:1 (n-9) c	0.11 ± 0.018	0.10 ± 0.001	0.10 ± 0.011	0.09 ± 0.009	0.12 ± 0.004
20:1 (n-9)	0.04 ± 0.008	0.03 ± 0.004	0.03 ± 0.006	0.03 ± 0.005	0.03 ± 0.005
24:1 (n-9)	0.10 ± 0.021	0.09 ± 0.013	0.13 ± 0.04	0.11 ± 0.016	0.12 ± 0.027
18:2 (n-6) t	0.15 ± 0.069	0.19 ± 0.026	0.12 ± 0.073	0.04 ± 0.031	0.03 ± 0.004
20:2 (n-6)	0.02 ± 0.014	0.02 ± 0.006	0.02 ± 0.016	0.01 ± 0.010	0.03 ± 0.006
20:3 (n-6)	0.03 ± 0.004	0.04 ± 0.006	0.04 ± 0.005	0.03 ± 0.009	0.04 ± 0.009
20:4 (n-6)	0.13 ± 0.030b	0.16 ± 0.008ab	0.20 ± 0.042a	0.16 ± 0.023ab	0.19 ± 0.020a
18:3 (n-3)	0.07 ± 0.015	0.07 ± 0.011	0.07 ± 0.011	0.04 ± 0.012	0.04 ± 0.004
18:4 (n-3)	0.01 ± 0.011	0.02 ± 0.002	0.02 ± 0.008	Traza	N.D.
20:3 (n-3)	0.05 ± 0.008	0.05 ± 0.003	0.05 ± 0.005	0.03 ± 0.019	0.05 ± 0.004
20:5 (n-3)	0.28 ± 0.038a	0.27 ± 0.016a	0.27 ± 0.026a	0.19 ± 0.045b	0.23 ± 0.026ab
22:5 (n-3)	0.18 ± 0.033	0.14 ± 0.003	0.17 ± 0.039	0.18 ± 0.022	0.25 ± 0.022
22:6 (n-3)	1.28 ± 0.09	1.25 ± 0.023	1.37 ± 0.088	1.16 ± 0.100	1.23 ± 0.144
Peso de embrión	28.8 ± 1.300	29.2 ± 1.200	30.1 ± 0.500	30.1 ± 1.600	30.2 ± 1.300
AGT	4.15 ± 0.298ab	4.06 ± 0.141ab	4.20 ± 0.048ab	3.81 ± 0.342b	4.50 ± 0.161a
AGS	0.96 ± 0.113b	0.93 ± 0.041b	0.95 ± 0.093b	0.95 ± 0.121b	1.24 ± 0.043a
AGMI	0.99 ± 0.125b	0.92 ± 0.023b	0.94 ± 0.048b	1.01 ± 0.123ab	1.18 ± 0.089a
AGPI	2.21 ± 0.187	2.21 ± 0.078	2.31 ± 0.172	1.85 ± 0.236	2.08 ± 0.194
AGE	1.68 ± 0.118	1.67 ± 0.031	1.84 ± 0.127	1.51 ± 0.164	1.65 ± 0.180
Σ (n-6)	0.33 ± 0.053abc	0.41 ± 0.027a	0.38 ± 0.082ab	0.24 ± 0.064c	0.28 ± 0.023bc
Σ (n-3)	1.87 ± 0.136	1.80 ± 0.053	1.93 ± 0.105	1.60 ± 0.175	1.80 ± 0.179
ArA/EPA	0.47	0.59	0.74	0.87	0.81
DHA/EPA	4.68	4.73	5.04	6.29	5.27

Los valores representan la media ± la desviación estándar. Literales diferentes entre columnas indican diferencias estadísticas ($P < 0.05$).

8. Discusión

8.1. Validez de resultados

Respecto a los parámetros de calidad del agua del SCID, la temperatura promedio se mantuvo entre los 20.5 y 21.5 °C, que se encuentra dentro del intervalo térmico de 20-24 °C que corresponde a la temporada natural de reproducción de *Paralabrax maculatofasciatus* en la Bahía de la Paz (Ocampo-Cervantes, 2002). Esta temperatura fue más baja que la recomendada por Rosales-Velázquez *et al.* (1992) para la reproducción en cautiverio de esta especie, sin embargo, fue adecuada para inducir a la maduración, ovulación y desove voluntario durante todo el período experimental y contribuyó a evitar epizootias causadas por *Cryptocarium irritans*.

Por otra parte, la concentración de oxígeno se mantuvo entre 5.6 a 5.9 mg/l, intervalo adecuado para el mantenimiento de peces marinos (>5 mg/l, Tucker, 1998) y la salinidad dentro de lo que se considera oceánica (35‰), la cual es recomendable para el mantenimiento de especies marinas estenohalinas (Tucker, 1998).

En cuanto a la condición de peso (g) y longitud (cm) de los reproductores, al inicio del experimento, no se encontraron diferencias significativas entre los tanques, ni entre los sexos. Al final del experimento, los reproductores incrementaron de peso y talla de manera homogénea, sin presentar diferencias significativas entre los tanques, ni entre los sexos.

En cuanto a los resultados de la composición química y de ácidos grasos de los alimentos, se observó que presentaron una composición de proteínas, lípidos totales y ácidos grasos similares a los niveles de formulación, excepto por el alimento 4, el cual presentó diferencias respecto a su valor de formulación principalmente en cuanto al nivel de AGAI. La causa de esta diferencia es posible que se deba a que el alimento 4 permaneció en el secador más tiempo que los otros alimentos. Los lípidos y principalmente los AGAI son termolábiles, por lo que un largo tiempo de exposición al calor y oxígeno, pueden descomponer y oxidar fácilmente estos compuestos. Esto se infiere ya que en el alimento 4 la relación ArA/EPA es igual a la formulación, pero los niveles de estos ácidos grasos sí se vieron modificados.

Por lo tanto, de acuerdo con los resultados de la calidad del agua del SCID y de la condición inicial y final de los reproductores, los cuales sugieren que las variables ambientales y condición de los peces se mantuvieron dentro de los intervalos óptimos recomendados, es posible afirmar que no fueron factores que afectaron o intervinieron en los parámetros evaluados y que los resultados de estas evaluaciones fueron consecuencia de la composición de los alimentos proporcionados.

8.2. Efecto del nivel de ArA de los alimentos experimentales y fresco sobre la fecundidad de los reproductores

Se acepta, de manera general, que la nutrición (composición del alimento) y la alimentación (régimen alimentario, frecuencia de alimentación, entre otras) de peces reproductores, tiene un efecto directo sobre la reproducción (fecundidad, frecuencia de desove, entre otras) y la calidad de embriones y larvas (Watanabe, 1985; Luquet y Watanabe, 1986; Bromage, 1995; Izquierdo y Fernández-Palacios, 1997; Izquierdo *et al.*, 2001; Watanabe *et al.*, 2003). La reducción en la fecundidad puede ser causada por el desbalance de nutrientes que influyen sobre el eje endocrino hipotálamo-hipófisis-gónadas, o por la indisponibilidad de algún nutriente para la formación del óvulo (Izquierdo *et al.*, 2001), tal como ocurre con desbalances o deficiencias de AGE (DHA, EPA y ArA) en el alimento de reproductores (Harel *et al.*, 1994; Rainuzzo *et al.*, 1997; Izquierdo *et al.*, 2001).

En el presente estudio, la fecundidad parcial se reportó como el número de óvulos desovados por lote de reproductores por día, y mostró diferencias significativas entre los tratamientos alimentarios, en donde, la fecundidad parcial obtenida con el alimento 1, fue significativamente mayor a las obtenidas con el resto de los tratamientos alimentarios, y la fecundidad parcial obtenida con el alimento 4 fue significativamente menor, excepto con la obtenida a partir del alimento fresco. Estos resultados no parecen estar relacionados con los niveles de ArA, AGE o AGPI del alimento, sino con la razón ArA/EPA en una relación inversa, ya que se observó una tendencia a aumentar la fecundidad parcial conforme disminuyó la razón ArA/EPA del alimento.

Estos resultados contrastan con los obtenidos por Martínez-Brown (2007), en un estudio sobre nutrición de reproductores de la misma especie. Este autor no detectó diferencias significativas en la fecundidad parcial promedio de reproductores sometidos a alimentos con diferentes niveles de AGE; no obstante, señaló una tendencia a aumentar la fecundidad parcial promedio con el aumento de AGE en el alimento. Sin embargo, la razón ArA/EPA determinada en la mojarra (0.7) por este autor, es similar a la obtenida en el presente trabajo (0.8).

En el presente estudio, la razón ArA/EPA en el alimento con la que se obtuvo la mayor fecundidad parcial fue de 0.18, que es similar a la razón que proponen Mazorra *et al.* (2003) para reproductores de *H. hippoglossus* (0.2-0.3), menor que la razón con la que obtienen los mejores resultados en el estudio de Furuita *et al.* (2003) en reproductores de *Paralichthys olivaceus* (0.7) y mayor que la razón determinada por Fernández-Palacios *et al.* (2003) en reproductores de *Sparus aurata* (0.07).

En estudios realizados en *Carassius auratus*, *Perca flavescens* y *Dicentrarchus labrax*, se ha demostrado que las prostaglandinas (PG) producidas a partir del ArA por las ciclooxigenasas (PGE_2 y $PGF_{2\alpha}$), estimulan la producción de hormonas esteroides (testosterona, estradiol, pregnenolona, entre otras) en las células de la granulosa, lo cual induce la vitelogénesis (PGE_2), la maduración final (PGE_2 y $PGF_{2\alpha}$), el comportamiento reproductivo y el desove ($PGF_{2\alpha}$) (Goetz y Theofan, 1979; Stacey y Goetz, 1982; Berndtson *et al.*, 1989; Chang *et al.*, 1989; Van Der Kraak y Chang, 1990; Sorensen, 1992; Mercure y Van Der Kraak, 1996; Goetz y Garczynski, 1997; McDougall y Van Der Kraak, 1998; Sorbera *et al.*, 2001; Sorensen y Stacey, 2004). No obstante, las prostaglandinas producidas a partir del EPA (PGE_3), no parecen tener efecto sobre la maduración final (Sorbera *et al.*, 2001), y en estos trabajos no se reportan efectos de PGE_3 sobre la vitelogénesis y el desove.

Sin embargo, con la información que se tiene acerca de la función de las PG en el tejido ovárico, los autores arriba mencionados han sugerido las siguientes dos hipótesis: i) niveles altos de PGE_2 tienen un efecto inhibitorio sobre el proceso de maduración de los oocitos (Sorbera *et al.*, 2001) y ii) un aumento en la ovulación

asociado al alto contenido de EPA en el alimento es debido a una mayor producción de PGE₃ (Abayasekara y Wathes, 1999), que son biológicamente menos activas que las PGE₂ (Sargent, 1995; Bell y Sargent, 2003), ya que los sistemas enzimáticos para la producción de eicosanoides tienen mayor afinidad por el ArA que por el EPA (Sargent *et al.*, 1999; Tocher, 2003), por lo que las cantidades relativas de ArA y EPA en el alimento, regulan su contenido mutuo en las membranas de los folículos y a su vez determinan la producción relativa de PGE₂: PGE₃ (Abayasekara y Wathes, 1999).

En el presente estudio, de acuerdo con los resultados obtenidos de fecundidad parcial, se sugiere la segunda hipótesis como posible explicación, ya que la mayor fecundidad se obtuvo de reproductores alimentados con el alimento 1, el cual presentó la razón ArA/EPA más baja, y la fecundidad menor se obtuvo de reproductores alimentados con el alimento 4 y con la mojarra, los cuales presentaron la razón ArA/EPA más alta, no obstante que el contenido de ArA de estos tres alimentos fue más próximo entre ellos, y más bajo que el del resto de los alimentos experimentales. Estos resultados resaltan la importancia de una adecuada proporción de ArA/EPA en el alimento para reproductores, ya que un desbalance entre el contenido de ArA y EPA puede tener como consecuencia un desbalance en la regulación de la actividad de los eicosanoides implicados en la esteroideogénesis (Sargent *et al.*, 1999; Mazorra *et al.*, 2003) y esto a su vez, puede provocar problemas reproductivos que se originan en los diferentes sitios del eje endocrino hipotálamo-hipófisis-gónada.

8.3. Efecto del nivel de ArA de los alimentos experimentales y fresco sobre la composición de los embriones

El conocimiento actual sobre la interacción nutrición-reproducción de peces se ha obtenido, en su mayor parte, de estudios en especies de importancia acuícola, enfocados a determinar el efecto del contenido de algún nutrimento del alimento (proteínas, lípidos, vitaminas, entre otros), y en particular de nutrimentos esenciales (AGE, AAE, Vitamina C, entre otros), sobre la composición final del vitelo, lo cual determina la calidad de los embriones y larvas (Luquet y Watanabe, 1986; Mourente

y Odriozola, 1990; Harel *et al.*, 1994; Brooks *et al.*, 1997; Izquierdo *et al.*, 2001; Sargent *et al.*, 2002; Watanabe y Vassallo-Agius, 2003).

En el presente trabajo, el contenido de AGE de embriones obtenidos de reproductores sometidos a los diferentes tratamientos alimentarios no presentó diferencias significativas, a pesar de las diferencias del contenido de AGE en los alimentos. No obstante, fue posible detectar diferencias al considerar a cada AGE por separado. El contenido de ArA en los embriones fue afectado por su contenido en el alimento, de manera que fue posible observar una tendencia a aumentar gradualmente su contenido en los embriones conforme incrementó su contenido en los alimentos. Un comportamiento similar fue observado en el contenido de EPA, evidenciado por la disminución de su concentración en los embriones obtenidos con el alimento 4 y fresco, que tuvieron 70 % menos EPA. Por otra parte, el contenido de DHA fue similar en los embriones obtenidos a partir de los alimentos artificiales y fresco.

Estos resultados confirman lo reportado por Martínez-Brown (2007) para reproductores de *P. maculatofasciatus* y son congruentes con los encontrados en embriones obtenidos de reproductores de *P. olivaceus* (Furuita *et al.*, 2003), *H. hippoglossus* (Mazorra *et al.*, 2003) y *Gadus morhua* (Salze *et al.*, 2005), a los cuales se les suministraron alimentos con diferentes niveles de ArA.

En especies que se alimentan durante la etapa reproductiva, como sucede en especies que presentan cortos períodos vitelogénicos, y desoves parciales y pelágicos (p.e. *Sparus aurata*, *Paralabrax* spp.), los nutrimentos del alimento son utilizados directamente para el crecimiento folicular, y en particular para la vitelogénesis (Harel *et al.*, 1994). Durante la vitelogénesis, los nutrientes transportados al hígado son utilizados para la síntesis de lipoproteínas de muy baja, baja y alta densidad (vitelogenina) precursoras del vitelo (Mommensen y Walsh, 1988; Brooks *et al.*, 1997; Patiño y Sullivan, 2002).

Debido a que los AGE son transportados al oocito principalmente por medio de proteínas (apoproteínas de alta densidad y vitelogenina) (Wiegand, 1996; Patiño y Sullivan, 2002), se ha sugerido que la especificidad de estas por los AGE se debe a una determinación genética (Pickova *et al.*, 1997). Esta puede ser la razón de que el contenido de AGE y DHA fuera similar entre los embriones obtenidos con los diferentes tratamientos alimentarios. No obstante, la variación en el contenido de ArA y EPA en los embriones pudo deberse a que por su estructura molecular similar, las proteínas de transporte pueden tener baja especificidad para ambos ácidos grasos, por lo que su abundancia relativa en el alimento determina de forma directa su contenido en el vitelo, como lo sugirió Martínez-Brown (2007).

8.4. Efecto del contenido de ArA de los embriones sobre la morfología de los blastómeros y la viabilidad de los embriones

El período embrionario está comprendido por tres fases: segmentación, embrión y eleuteroembrión (Balon, 2002). La fase de segmentación comienza con la activación del huevo, proceso caracterizado por la formación del espacio perivitelino, la liberación del contenido de los alveolos corticales y la diferenciación bipolar (Balon, 1990). Una vez formado el blastodisco, comienza su segmentación y la formación consecutiva de blastómeros, lo que origina la epibolia (gastrulación) y finaliza con el cierre del blastoporo, proceso que a su vez es el término de la fase de segmentación (Balon, 2002).

Las características morfológicas de los blastómeros (simetría celular, tamaño celular, adhesión celular, resolución de membranas e inclusiones citoplasmáticas), entre la segunda y quinta división del blastodisco (estadios de 4-32 células) en la fase de segmentación, han sido utilizadas para predecir la calidad de embriones y larvas de *Gadus morhua* (Kjørsvick y Lonning, 1983; Kjørsvick *et al.*, 1994; Mangor-Jensen y Holm, 1994; Pickova *et al.*, 1997; Nissling *et al.*, 1998, Vallin y Nissling, 1998; Salze *et al.*, 2005), *Hippoglossus hippoglossus* (Bruce *et al.*, 1993; Bromage *et al.*, 1994; Shields *et al.*, 1997; Mazorra *et al.*, 2003), *Sparus aurata* (Fernández-Palacios *et al.*, 1995), *Lates calcarifer* (Nocillado *et al.*, 2000), *Psetta maxima* (Kjørsvick *et al.*, 2003), *Melanogrammus aeglefinus* (Rideout *et al.*, 2004) y en

Paralabrax maculatofasciatus (Martínez-Brown, 2007) o como criterios para especificar los efectos teratogénicos que causan determinados xenobióticos del ambiente en *G. morhua*, *Sprattus sprattus* y *Pleuronectes platessa* (Westernhagen, 1998).

En el presente trabajo, el valor de forma de los blastómeros de embriones obtenidos con los alimentos 1, 2 y 3 parecería tener una relación inversa con el nivel de araquidónico de los embriones. Sin embargo, los embriones obtenidos con el alimento 4 tuvieron una concentración de ArA similar al de los obtenidos con el alimento 2 y los obtenidos con el alimento fresco resultaron con la concentración mayor, lo que hace evidente que el contenido de ArA en los embriones no es el único factor que determina la morfología de los blastómeros. No obstante, los valores de forma de embriones obtenidos con los alimentos experimentales son mayores a los reportados por Martínez-Brown (2007) para la misma especie y son congruentes con los resultados obtenidos por Mazorra *et al.* (2003) en *Hippoglossus hippoglossus*.

Martínez-Brown (2007) encontró que los embriones con menor contenido de ArA, obtenidos de reproductores de la misma especie alimentados con alimentos experimentales con niveles traza de ArA, tuvieron menor valor de forma que los embriones con mayor contenido de ArA obtenidos con el alimento fresco, por lo que sugirió que el contenido de ArA en los embriones fue determinante para la segmentación. Resultados similares fueron obtenidos en *H. hippoglossus* (Mazorra *et al.*, 2003) y *Gadus morhua* (Salze *et al.*, 2005).

En el presente estudio, el contenido mínimo de ArA en el embrión, derivado de su contenido en el alimento no fue un factor limitante, por lo que parece ser suficiente para obtener valores de forma de los blastómeros iguales a la de embriones obtenidos con el alimento fresco.

La viabilidad de los embriones, determinada como la fracción de huevos flotantes y expresada generalmente como porcentaje, ha sido utilizada como un criterio de calidad, por ejemplo, en: *Sparus aurata* (Mourente y Odriozola *et al.*, 1990; Harel *et al.*, 1994; Fernández-Palacios *et al.*, 1995; Almasa *et al.*, 1999; Lahnsteiner y

Patarnello, 2003 y 2004) *Dicentrarchus labrax* (Carrillo *et al.*, 1995; Navas *et al.*, 1997; Bruce *et al.*, 1999), *Pagrus major* (Watanabe y Kiron, 1995), *Paralichthys olivaceus* (Furuita *et al.*, 2000, 2001, 2002 y 2003), *Seriola quinqueradiata* (Vassallo-Agius *et al.*, 2001a y 2002), *Psetta maxima* (Kjørsvik *et al.*, 2003), *Pseudocaranx dentex* (Vassallo-Agius *et al.*, 2001b y c), *Gadus morhua* (Salze *et al.*, 2005), *Puntazzo puntazzo* (Lahnsteiner y Patarnello, 2004) y *Paralabrax maculatofasciatus* (Rosales-Velázquez, 1997; Martínez-Brown, 2007).

En los estudios realizados en las especies arriba mencionadas, la fracción de huevos flotantes o viabilidad corresponde a la tasa de fecundación y la fracción precipitada corresponde solo a óvulos sin fecundar. Sin embargo, en el presente estudio, el porcentaje de viabilidad obtenido con los alimentos experimentales, con excepción del obtenido con alimento fresco, no corresponde a la tasa de fecundación, ya que la fracción precipitada, en todos los casos, estuvo constituida mayormente por embriones que murieron durante el proceso de epibolia y no completaron el cierre del blastoporo.

No obstante, en este trabajo, se observó un comportamiento homólogo en los resultados del porcentaje de viabilidad y el valor de forma de los blastómeros, con respecto al contenido de ArA de los embriones, lo cual no fue observado por Martínez Brown (2007), quién reportó índices de viabilidad obtenidos con los alimentos experimentales similares a los obtenidos con el alimento fresco. La diferencia entre los alimentos experimentales de este autor y los utilizados en el presente trabajo, es el nivel de inclusión de los aceites de hígado de bacalao y de girasol, los cuales fueron cinco veces mayores, con respecto al nivel de inclusión en este estudio. Esto indica que algunos nutrimentos liposolubles encontrados en estos aceites pudieron ser el factor limitante para el desarrollo del embrión. El aceite de girasol aporta vitamina E (α -tocoferol) (Gopala-Krishna *et al.*, 2006) y el de hígado de bacalao vitamina A, E, D y carotenoides (Mattill y Golumbic, 1941; Allen, 1995). Las vitaminas A y E, y los carotenoides, como la astaxantina, son parte del sistema antioxidante no enzimático a nivel celular (Akworth y Bailey, 1995; Martínez-Álvarez *et al.*, 2005; Burak Çimen, 2008) y no pueden ser sintetizados por los peces, por lo

que son esenciales y deben ser suministrados en el alimento (Miki *et al.*, 1983; Palace y Werner, 2006; Mourente *et al.*, 2007).

Al reducir el nivel de inclusión del aceite de hígado de bacalao y de girasol en los alimentos experimentales, posiblemente se redujo también la transferencia de vitaminas A y E, y carotenoides, a los oocitos durante la vitelogénesis.

Durante el período embrionario, en la fase de segmentación, el blastodisco se segmenta y da origen a tres capas embrionarias: la capa de células envolventes, la de células profundas y el periblasto (Collazo *et al.*, 1994). Después de la formación de estas capas embrionarias comienza la epibolia, que es el proceso de gastrulación por el cual el blastodisco se desplaza sobre el vitelo, cubriéndolo y dando origen, con sus movimientos morfogénicos celulares, al anillo germinal y al escudo embrionario. Una vez que termina la epibolia con el cierre del blastoporo, dan origen al eje del embrión y con éste, al inicio de la organogénesis (Collazo *et al.*, 1994; Falk-Petersen, 2005). Durante este proceso existe una activa división y diferenciación celular, por lo que debido a su alta actividad metabólica, se producen altos niveles de especies reactivas de oxígeno (Mourente *et al.*, 1999; Kilaimani *et al.*, 2007), tales como anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$), peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y radicales libres hidroxilos (OH^{\cdot}), que son producto del metabolismo aerobio celular (Ackworth y Bailey, 1995; Martínez-Álvarez *et al.*, 2005; Genestra, 2007; Burak Çimen, 2008), los cuales pueden causar daños a las membranas celulares por acción de peroxidación de ácidos grasos, principalmente de los AGAI (ArA, EPA y DHA) (Izquierdo *et al.*, 2001; Balboa y Balsinde, 2006; Mourente *et al.*, 2007).

Las especies reactivas de oxígeno son destoxificadas principalmente por el sistema antioxidante no enzimático (vitaminas A, C y E y carotenoides) al inicio del período embrionario (Palace y Werner, 2006), por lo que el contenido de éstos nutrientes afecta el mantenimiento, integridad y función de membranas celulares y de la movilización de ácidos grasos para la producción de eicosanoides.

Con respecto a esto, ha sido reportado un fenómeno teratogénico (síndrome M74) relacionado con un alto contenido de DHA y óxidos de colesterol y bajo contenido astaxantina en embriones de *Salmo salar* en el mar Báltico (Pickova *et al.*, 2003). De manera análoga, se ha reportado hipertrofia del vitelo de eleuteroembriones de *Sparus aurata* obtenidos de reproductores alimentados con alto contenido de AGAI n-3 (Fernández-Palacios *et al.*, 1995). Sin embargo, esto fue corregido con un aumento del contenido de α -tocoferol en el huevo, como consecuencia de un incremento de esta vitamina en el alimento de reproductores (Fernández-Palacios *et al.*, 1998). Resultados similares fueron reportados en *Anguilla japonica* (Furuita *et al.*, 2003).

De la misma forma, el aumento en el contenido de astaxantina en el alimento de reproductores de *Pseudocaranx dentex* (Vassallo-Agius *et al.*, 2001a) y *Seriola quinqueradiata* (Vassallo-Agius *et al.*, 2001a) y de vitamina E en *Chanos chanos* (Emata *et al.*, 2000), aumentó el porcentaje de la fracción flotante del desove.

Por lo anterior, la muerte ocurrida durante la gastrulación en la fracción de embriones precipitados pudiera ser atribuida al estrés oxidativo derivado de un desbalance entre el contenido de AGPI y el de vitaminas y pigmentos en embriones, debido a una acumulación diferencial de estos compuestos del sistema antioxidante en los oocitos durante la vitelogénesis por causa de deficiencias de estos nutrientes en los alimentos experimentales suministrados a los reproductores en el presente estudio.

8.5. Efecto del contenido de ArA de los embriones sobre la tasa de eclosión, sobrevivencia larvaria, sobrevivencia larvaria al estrés hiperosmótico agudo y sobrevivencia larvaria a la inanición

La eclosión es el proceso por el cual el embrión emerge de la envoltura del huevo (envoltura de fertilización o corion) que lo contiene, por medio de la secreción de enzimas de eclosión de glándulas celulares y la coriólisis enzimática, facilitada por los movimientos del embrión y disparada por estímulos ambientales (Yamagami, 1981).

En estudios realizados en *Paralichthys olivaceus* (Furuita *et al.*, 2003), *Hippoglossus hippoglossus* (Mazorra *et al.*, 2003) y *Gadus morhua*. (Salze *et al.*, 2005) se ha encontrado una relación entre el contenido de ArA de los embriones y la tasa de eclosión.

En el presente estudio, no se detectaron diferencias en la tasa de eclosión obtenida de reproductores alimentados con los diferentes tratamientos de ArA y alimento fresco, y no hay evidencia de que la proporción de ArA/EPA o el contenido de ArA de los embriones estén relacionados con estos resultados.

Las tasas de eclosión promedio obtenidas con los alimentos experimentales fueron mayores con cerca del 10 % que las tasas de eclosión promedio reportadas por Rosales-Velázquez (1997), Avilés-Quevedo (2005) y Martínez-Brown (2007) para la misma especie, obtenidas con alimentos experimentales con niveles traza de ArA, y similares a las obtenidas por éstos mismos autores con el alimento fresco. Sin embargo, debido a la variación de los resultados en los cuatro estudios, es posible que tales diferencias no sean significativas, lo que hace evidente que, en conjunto con el alto valor de morfología de los blastómeros en este trabajo, la tasa de eclosión no es un indicador determinante de la calidad de los embriones, lo que resulta congruente con lo reportado por Martínez-Brown (2007), ya que menciona que la eclosión no es un umbral ontogénico en *P. maculatofasciatus*.

Una vez que los organismos desarrollan la capacidad de ingestión y digestión intestinal, comienza la etapa de nutrición mixta y con ello la fase de apterolarva del período larvario (Balon, 1999). Algunos trabajos realizados en *Paralichthys olivaceus* (Furuita *et al.*, 2003) y *Gadus morhua* (Pickova *et al.*, 1997), han encontrado una relación entre el contenido de ArA del embrión y la sobrevivencia al inicio del período larvario. En el presente estudio se obtuvo la misma sobrevivencia larvaria con los diferentes tratamientos alimentarios de reproductores. En estos resultados no parece estar implicado el contenido de ArA, ni la razón ArA/EPA de los embriones, lo cual es congruente con lo reportado por Martínez-Brown (2007) para la misma especie.

Los promedios de sobrevivencia larvaria obtenidos con los alimentos experimentales y fresco en el presente trabajo son 22 % menores que los reportados por Rosales-Velázquez (1997) y 46 % mayores a los reportados por Martínez-Brown (2007) para la misma especie. Sin embargo, la sobrevivencia larvaria del presente trabajo puede no tener diferencias con la reportada por Rosales-Velázquez (1997) debido a la variación, pero sí con la reportada por Martínez-Brown (2007), lo cual puede ser un efecto del método de incubación, ya que Martínez-Brown (2007) utilizó unidades de incubación sumergidas en un sistema de recirculación, mientras que en este trabajo se aplicó el método de incubación en microplacas, también utilizado en *Hippoglossus hippoglossus* (Shields *et al.*, 1997), *Diplodus sargus*, *Sparus aurata*, *Dicentrarchus labrax* (Carrillo *et al.*, 2000; Panini *et al.*, 2001) y *Anguilla japonica* (Unuma *et al.*, 2004). Esto fue comprobado por Carrillo *et al.* (2000) ya que compararon el método de incubación en microplacas contra un método de incubación en un sistema de recirculación, encontraron que la sobrevivencia larvaria fue significativamente mayor con el método de incubación en microplacas.

En el presente estudio se utilizó como criterio de calidad una prueba de estrés hiperosmótico agudo, el cual es un nuevo método para la evaluación de la salud y resistencia de las larvas y tiene como único antecedente el método desarrollado por Martínez-Brown (2007), con el cual difiere en la forma de incubación, salinidad y tiempo de exposición. No obstante a las diferencias entre estos dos métodos de evaluación de la calidad mediante estrés hiperosmótico agudo, el valor comparativo se mantiene, debido a que en ambos estudios se utilizaron embriones producidos con mojarra como grupo control. En el presente trabajo, las larvas obtenidas de reproductores alimentados con los alimentos experimentales y frescos no presentaron diferencias en el porcentaje de sobrevivencia al estrés hiperosmótico agudo. Martínez-Brown (2007) reportó para la misma especie, que las larvas derivadas de embriones que tuvieron mayor contenido de ArA, los cuales fueron obtenidos con mojarra, lograron la mayor sobrevivencia a esta prueba, comparada con la alcanzada por las larvas derivadas de los embriones que tuvieron menor contenido de ArA, obtenidos con los alimentos experimentales con niveles traza de ArA. La alta sobrevivencia de larvas la atribuyó al contenido de ArA de los

embriones, debido al mayor contenido de ArA del alimento fresco. Esto puede ser soportado con los resultados aquí presentados, ya que los embriones que se obtuvieron con el alimento 1 tuvieron un contenido de ArA similar al reportado por este autor para los embriones obtenidos con el alimento fresco. Esto permite sugerir que los niveles de ArA probados en este estudio cubrieron las necesidades de los reproductores para formación del vitelo y que el nivel de ArA del alimento 1 es suficiente para cubrir estas necesidades.

El ArA y los eicosanoides derivados de éste ácido graso son importantes para mantener la osmorregulación debido a que están implicados en la modulación de las hormonas del eje endocrino hipotálamo-hipófisis-interrenal (Iwama, 1998; Mommsen *et al.*, 1999; Bell y Sargent, 2003; Ganga *et al.*, 2006), en la proliferación de ionocitos y la activación de la Na^+/K^+ -ATPasa (Varsamos *et al.*, 2005).

No obstante, el estrés osmótico aumenta la tasa metabólica de las larvas (Varsamos *et al.*, 2006) y puede ser causa de estrés oxidativo. En tal caso, las larvas obtenidas de reproductores alimentados con alimento fresco debieron tener una mayor sobrevivencia que las obtenidas con los alimentos experimentales en el presente trabajo. Esto puede tomarse como evidencia indirecta de una acumulación diferencial de los nutrimentos antioxidantes en los oocitos durante la vitelogénesis.

En el presente estudio, las larvas obtenidas de reproductores a los cuales se les suministraron los alimentos artificiales y el fresco, no presentaron diferencias significativas de sobrevivencia a la inanición a las 24 y 72 h después de la absorción del vitelo. No obstante, las larvas obtenidas con el alimento 4 presentaron una sobrevivencia significativamente mayor que las logradas por las larvas obtenidas con el resto de los alimentos experimentales y el fresco a las 48 h después de la absorción del vitelo. Estos resultados aparentemente no están relacionados con el contenido de ArA, AGAI, AGS o AGMI y son menores que los reportados por Martínez-Brown (2007) de larvas de la misma especie, obtenidas con alimentos artificiales con contenido trazas de ArA y el alimento fresco sometidas al mismo período de inanición.

8. Conclusiones

Bajo el esquema en el que se realizó este estudio se concluye lo siguiente:

El contenido de ArA, así como la relación ArA/EPA en el alimento de reproductores de *Paralabrax maculatofasciatus*, mostró una relación inversamente proporcional con la fecundidad parcial. Por lo tanto, incluir en el alimento de reproductores un nivel de ArA de 0.17 % en base seca y una relación ArA/EPA de 0.18, permite obtener una fecundidad parcial incluso mayor a la obtenida con el alimento fresco.

El contenido de ArA y EPA en los embriones presentó una relación directamente proporcional con el contenido de estos ácidos grasos en el alimento de reproductores, mientras que el contenido de DHA en los embriones fue similar independientemente del contenido de este ácido graso en los alimentos experimentales y el fresco.

Los resultados de la viabilidad de los embriones, sugieren que hay otros factores nutricionales, aparte del ArA y de los AGE, que intervienen en el proceso del desarrollo durante la fase de segmentación, ya que durante la epibolia se presentó una alta mortalidad de los embriones obtenidos con los alimentos experimentales y no con la mojarra.

Un contenido de ArA del 0.17 % con una relación ArA/EPA de 0.18, fue suficiente para obtener una morfología de los blastómeros, tasa de eclosión, sobrevivencia larvaria, sobrevivencia larvaria al estrés hiperosmótico agudo y sobrevivencia a inanición, similares a los obtenidos de reproductores alimentados con mojarra, lo cual permite sugerir este nivel de ArA como aproximado al requerimiento de reproductores de esta especie.

10. Recomendaciones

Se recomienda incluir en el alimento de reproductores de *Paralabrax maculatofasciatus* un nivel de ácido araquidónico de 0.17% en base seca y mantener la relación ArA/EPA de 0.18, para obtener una mayor fecundidad y asegurar la producción de embriones y larvas de buena calidad.

En el presente estudio, la fracción de embriones no viables murieron durante el proceso de epibolia, durante el cual ocurre una alta actividad metabólica y en consecuencia una alta liberación de especies reactivas de oxígeno. Debido a lo anterior, se plantea la hipótesis de que un desbalance entre los AGE y antioxidantes en el alimento de reproductores, aunado a la alta producción de radicales libres durante la epibolia, producen la oxidación excesiva de los AGE en el vitelo y membranas celulares y en consecuencia, la muerte del embrión en ese proceso de desarrollo. Por lo anterior y con el objeto de establecer una fórmula del alimento artificial completo para reproductores de *P. maculatofasciatus* con el que se pueda sustituir el alimento fresco, se recomienda realizar estudios sobre los requerimientos de antioxidantes en reproductores de esta especie, como el de la vitamina E (alfa-tocoferol), astaxantinas y vitamina C, sus proporciones relativas y la interacción de estos compuestos con los AGE.

Así también, se recomienda en la realización de estos trabajos, emplear el procedimiento de incubación de los embriones en microplacas de 96 pozos, para la evaluación de la tasa de eclosión, sobrevivencia larvaria y sobrevivencia a inanición, así como la incubación en microplacas de 48 pozos, para la evaluación de la sobrevivencia al estrés hiperosmótico agudo. Este método resultó práctico y con muchas ventajas respecto a los métodos utilizados en trabajos anteriores, ya que permitió un seguimiento individual del embrión desde antes de la eclosión hasta la muerte por inanición y evitó la manipulación durante las evaluaciones.

Con respecto al procedimiento de elaboración de alimentos para reproductores que generalmente incluyen altas concentraciones de lípidos y ácidos grasos, se recomienda un monitoreo continuo de la humedad de los alimentos cuando se utilizan estufas de convección, ya que una sobre exposición de estos al calor y al aire, produce una rápida oxidación de los AGAI, particularmente cuando el valor de humedad esta cercano al 10 %, con lo cual se alteran los niveles de formulación.

11. Bibliografía

- Abayasekara, D.R.E. y D.C. Wathes.** 1999. Effects of altering dietary fatty acid composition on prostaglandin synthesis and fertility. *Prostag. Leukotr. Ess.*, 61: 275-287.
- Acworth, I.N. y B. Bailey.** 1995. *The handbook of oxidative metabolism*. ESA, Chelmsford, 38 p.
- Allen, D.A.** 1995. Fish oil compositions, 95-108. *En: Hamilton R.J. y Rice R.D. (Eds) Fish Oil: Tecnology, Nutrition and Marketing*. Barnes and Associates, Bridgwater, 139 p.
- Allen, L.G., T.E. Hovey, M. Love y T. Smith.** 1995. The life history of the spotted sand bass (*Paralabrax maculatofasciatus*) within the southern California Bight. *Calif. Coop. Ocean. Fish. Invest. Rep.*, 36: 193-203.
- Allen, G.R. y D.R. Robertson.** 1998. Peces del Pacífico oriental tropical. CONABIO y Agrupación Sierra Madre S.C. México. 327 p.
- Almansa, E., M.J. Pérez, J.R. Cejas, P. Badía, J.E. Villamandos y A. Lorenzo.** 1999. Influence of broodstock gilthead seabream (*Sparus aurata* L.) dietary fatty acids on egg quality and egg fatty acid composition throughout the spawning season. *Aquaculture*, 170: 323-336.
- Alvarez-González, C.A.** 2003. *Actividad enzimática digestiva y evaluación de dietas para el destete de larvas de la cabrilla arenera Paralabrax maculatofasciatus (Percoidei: Serranidae)*. Tesis de Doctorado. CICIMAR-IPN, La Paz, B.C.S., México. 164p.
- Alvarez-González, C.A., R. Civera-Cerecedo, J.L. Ortíz-Galindo, S. Dumas, M. Moreno-Legorreta y T. Grayeb-Del Alamo.** 2001a. Effect of dietary protein level on growth and body composition of juvenile spotted sand bass, *Paralabrax maculatofasciatus*, fed practical diets. *Aquaculture*, 194: 151-159.
- Alvarez-González, C.A., H. Nolasco-Soria, R. Civera-Cerecedo, S. Dumas, J.L. Ortiz-Galindo, M.O. Rosales-Velázquez.** 2001b. Development of some digestive enzymes in spotted sand bass *Paralabrax maculatofasciatus* larvae, 44-47. *En: Hendry C.I., G. Van Stapien, M. Wille y P. Soorgelos (Eds.). Larvi '05 – fish and shellfish larviculture symposium*, European Aquaculture Society, publicación especial no.30, Oostende, Bélgica.
- Alvarez-González, C.A., J.L. Ortíz-Galindo, S. Dumas, S.F. Martínez-Díaz, D.E. Hernández-Ceballos, T. Grayeb-Del Alamo, M. Moreno-Lagorreta, R. Peña-Martínez y R. Civera-Cerecedo.** 2001c. Effect of stocking density on growth and survival of spotted sand bass *Paralabrax maculatofasciatus* larvae in a closed recirculating system. *J. World Aquac. Soc.*, 32: 130-137.
- Anguas-Vélez, B.H., R. Civera-Cerecedo, M. Cadena-Roa, J. Guillaume y S.F. Martínez-Díaz.** 2000a. Studies on the nutrition of spotted sand bass *Paralabrax maculatofasciatus*: effect of the dietary protein level on growth and protein utilization in juveniles fed semipurified diets. *J. World Aquac. Soc.*, 31: 580-591.
- Anguas-Vélez, B.H., R. Civera-Cerecedo, M. Contreras-Olguín, R.A. Rueda-Jasso y J. Guillaume.** 2000b. Preliminary study on the timing of weaning of spotted sand bass (*Paralabrax maculatofasciatus*) larvae with a prepare diets: effects on growth and survival. *J. Appl. Aquaculture*, 10:1-15.
- AOAC.** 1995. *Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemist Vol. 1*. 16 ed. Washintong, D.C. 1234 p.
- Arredondo-Figueroa, J.L., L.M. Zabalegui-Medina, J.L. Espinosa-Aranda, R. Campos-Verduzco y C. Hernández-Espíndola.** 1994a. *Desarrollo científico y tecnológico del cultivo de jurel*. SEPESCA-IMIT, A.C. 62 p.
- Arredondo-Figueroa, J.L., L.M. Zabalegui-Medina, J.L. Espinosa-Aranda, R. Campos-Verduzco, F. Gutiérrez-Salcedo y S. Hernández-Uribe.** 1994b. *Desarrollo científico y tecnológico del cultivo de corvina*. SEPESCA-IMIT, A.C. 72 p.
- Avilés-Quevedo, A.** 2005. *Calidad de huevos y larvas según el manejo de los reproductores de la cabrilla (Paralabrax maculatofasciatus, Pisces:Serranidae)*. Tesis de Doctorado. Universidad de Barcelona, Barcelona, España. 187 p.
- Avilés-Quevedo, A. y Mazón-Suástegui, J.M.** 1996. Cultivo de peces marinos, 651-684 p. *En: Casas-Valdez, M. y Ponce-Díaz, G (Eds.) Estudio del potencial pesquero y acuícola de Baja California Sur*. SEMARNAP, Gobierno del Estado de Baja California Sur, FAO, Instituto Nacional de la Pesca, UABCS, CIBNOR, CICIMAR, CETMAR.

- Avilés-Quevedo, A., U. Mc Gregor-Pardo, R. Rodríguez-Ramos, O. Morales-Castro, M.A. Huerta-Bello y M. Iizawa.** 1995. *Biología y cultivo de la cabrilla arenera Paralabrax maculatofasciatus (Steindachner, 1868)*. Secretaria de Pesca. Instituto Nacional de la Pesca y JICA. México. 85 p.
- Balboa, M.A., J. Balsinde.** 2006. Oxidative stress and arachidonic acid mobilization. *Biochim. Biophys. Acta*, 1761: 385-391.
- Balon, E.K.** 1990. Epigenesis of an epigeneticist: the development of some alternative concepts on the early ontogeny and evolution of fishes. *Guelph Ichthyol. Rev.*, 1: 42 p.
- Balon, E.K.** 1999. Alternative ways to become a juvenile or a definitive phenotype (and on some persisting linguistic offenses). *Environ. Biol. Fishes*, 56: 17-38.
- Balon, E.K.** 2002. Epigenetic processes, when *natura non facit saltum* becomes a myth, and alternative ontogenies a mechanism of evolution. *Environ. Biol. Fishes*, 65: 1-35.
- Barrera-Guevara, J.C., M.J. Román-Rodríguez y H.A. Licón-González.** 1994. *Desarrollo de la biotecnología para el cultivo de la totoaba*. SEPESCA-CIDESON. 89 p.
- Bell, J.G. y J.R. Sargent.** 2003. Arachidonic acid in aquaculture feeds: current status and future opportunities. *Aquac.* 218: 491-499.
- Bell, J.G., B.M. Farndale, M.P. Bruce, J.M. Navas, M. Carrillo.** 1997. Effects of broodstock dietary lipids on fatty acids composition of eggs from sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Aquac.* 149: 107-119.
- Berndtson, A.K., F.W. Goetz y P. Duman.** 1989. In vitro ovulation, prostaglandin synthesis, and proteolysis in isolated ovarian components of yellow Perch (*Perca flavescens*): Effects of 17 α ,20 β -Dihydroxy-4-pregnen-3-one and phorbol ester. *Gen. Comp. Endocr.*, 75: 454-465.
- Bligh, E.G. y Dyer, W.J.** 1959. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can. J. Biochem. Physiol.*, 37 (8): 911-917
- Bromage, N.** 1995. Broodstock management and seed quality – general considerations. *En: Bromage, N y Roberts, R. (Eds.) Broodstock management and egg and larval quality*. Blackwell Science. 424 p.
- Bromage, N., M. Bruce, N. Basavaraja y K. Rana.** 1994. Egg quality determinants in finfish: the role of overripening with special reference to the timing of stripping in the Atlantic halibut *Hippoglossus hippoglossus*. *J. World Aquac. Soc.*, 25: 13-21.
- Brooks, S., C.R. Tyler y J.P. Sumpter.** 1997. Egg quality in fish: what makes a good egg?. *Rev. Fish Biol. Fish.*, 7: 387-416.
- Brown, J.A., G. Minkoffb y V. Puvanendran.** 2003. Larviculture of Atlantic cod (*Gadus morhua*): progress, protocols and problems. *Aquaculture*, 227: 357-372.
- Bruce, M.P., R. J. Shields, M.V. Bell y N. R. Bromage.** 1993. Lipid class and fatty acid composition of eggs of Atlantic halibut, *Hippoglossus hippoglossus* (L.), in relation to egg quality in captive broodstock. *Aquac. Fish. Manag.*, 24: 417-422. Cadena-Roa, M. y Roldan-Liebenson, G. 1994. *Desarrollo científico y tecnológico del cultivo de la cabrilla*. SEPESCA-UABCS, La Paz, B.C.S. 93 p.
- Bruce, M., F. Oyen, G. Bell, J.F. Asturiano, B. Farndale, M. Carrillo, S. Zanuy, J. Ramos y N. Bromage.** 1999. Development of broodstock diets for the european sea bass (*Dicentrarchus labrax*) with special emphasis on the importance of n-3 and n-6 highly unsaturated fatty acid to reproductive performance. *Aquaculture*, 177: 85-97.
- Carrasco-Chávez, V.** 2004. *Variación de ácidos grasos durante la ontogenia inicial y requerimientos lipídicos de juveniles en cautiverio, de cabrilla arenera Paralabrax maculatofasciatus*. Tesis de Maestría. CICIMAR-IPN, La Paz, B. C. S., México. 76 pp.
- Carrasco-Chávez, V., J.L. Ortíz-Galindo, R. Civera-Cerecedo, C.A. Alvarez-González, T. Grayeb-Del Alamo, M.O. Rosales-Velázquez, M. Rodríguez-Trejo y J.M. Martínez-Brown.** 2005. Fatty acid composition of spotted sand bass *Paralabrax maculatofasciatus* during early ontogeny, 79-80. *En: Hendry C.I., G. Van Stapien, M. Wille y P. Soorgelos (Eds.) Larvi '05 – fish and shellfish larviculture symposium*, European Aquaculture Society, publicación especial no. 36, Oostende, Bélgica. 591 p.
- Carrillo, M., S. Zanuy, F. Oyen, J. Cerdà, J.M. Navas y J. Ramos.** 2000. Some criteria of the quality of the progeny as indicators of physiological broodstock fitness. *Cah. Options Mediterr.*, 47: 61-73.

- Carrillo, M., S. Zanuy, F. Prat, J. Cerdá, J. Ramos, E. Mananos y N. Bromage.** 1995. Sea bass (*Dicentrarchus labrax*), 138-168. *En: Bromage, N y Roberts, R. (Eds.) Broodstock management and egg and larval quality.* Blackwell Science. 424 p.
- Carta Nacional Pesquera.** 2004. Diario oficial de la federación. SAGARPA, Mexico.
- Chang, J.P., G.L. Freedman y R. De Leeuw.** 1989. Participation of arachidonic acid metabolism in gonadotropin-releasing hormone stimulation of goldfish gonadotropin release. *Gen. Comp. Endocr.*, 76: 2-11.
- Civera-Cerecedo, R., C.A. Alvarez-González, R.E. García-Gómez, V. Carrasco-Chávez, J.L. Ortiz-Galindo, M.O. Rosales-Velazquez, T. Grayeb-Del Álamo y F.J. Moyano-López.** 2007. Effects of micro-particulate diets on growth and survival of spotted sand bass larvae *Paralabrax maculatofasciatus* at tow early weaning times. *J. World Aquac. Soc.*, en prensa.
- Collazo, A., J.A. Bolker y R. Keller.** 1994. A phylogenetic perspective on teleost gastrulation. *Am. Nat.* 144: 133-154.
- Dumas, S., O. Rosales-Velázquez, M. Contreras-Olguín, D. Hernández-Ceballos y N. Silverberg.** 2004. Gonadal maturation in captivity and hormone-induced spawning of the Pacific red snapper *Lutjanus peru*. *Aquaculture*, 234: 615-623.
- Duncan, N.J., G.A. Rodríguez-M. de O., D. Alok y Y. Zohar.** 2003b. Effects of controlled delivery and acute injections of LHRHa on bullseye puffer fish (*Sphoeroides annulatus*) spawning. *Aquaculture*, 218: 625-635.
- Duncan, N.J., N. Garcia-Aguilar, G. Rodríguez-M. de O., M. Bernadet, C. Martínez-Chávez, C. Komar, P. Estañol y A. Garcia-Gasca.** 2003a. Reproductive biology of captive bullseye puffer (*Sphoeroides annulatus*), LHRHa induced spawning and egg quality. *Fish Physiol. Biochem.*, 28: 505-506.
- Eichler, V.B.** 1978. Atlas of comparative embryology. The C.V. Mosby Company, Missouri, U.S.A. 202 pp.
- Emata, A.C., I.G. Borlongan y J.P. Damaso.** 2000. Dietary vitamin C and E supplementation and reproduction of milkfish *Chanos chanos* Forsskal. *Aquac. Res.*, 31: 557-564.
- Emata, C. A., H. Y. Ogata, E.S. Garibay y H. Furuita.** 2003. Advanced broodstock diets for the mangrove red snapper and a potential importance of arachidonic acid in eggs and fry. *Fish Physiol. Biochem.*, 28: 489-491.
- Evans, R. P., P. Zhu, C.C. Parrich y J.A. Brown.** 2000. transformation in fisheries an aquaculture: lipid an aminoacid metabolism during early development of marine fish. Science Tech publishing. Canada. Cap. 36:477-493.
- Falk-Petersen, I.B.** 2005. Comparative organ differentiation during early life stages of marine fish. *Fish Shellfish Immun.*, 19: 397-412.
- FAO.** 2007. *FishStat*. FAO, Roma. 176 p.
- Fernández-Palacios, H., M.S. Izquierdo, M. Gonzalez, L. Robaina y A. Valencia.** 1998. Combined effect of dietary a-tocopherol and n13 HUFA on egg quality of gilthead seabream(*Sparus auratus*) broodstock. *Aquaculture*, 161: 475-476.
- Fernández-Palacios, H., M. Izquierdo, L. Robaina, A. Valencia, M. Salhi y J. Vergara.** 1995. Effect of HUFA n-3 level in broodstock diets on egg quality of gilthead seabream (*Sparus aurata*). *Aquaculture*, 132: 325-337.
- Ferry, L.A., S.L. Clark y G.M. Cailliet.** 1997. Food habits of spotted sand bass (*Paralabrax maculatofasciatus*) from Bahía de Los Angeles, Baja California. *Bull. Southern California Acad. Sci.* 96: 1-21.
- Fulks, W. y K.L. Main.** 1991. *Rotifer and microalgae culture systems*. Argent. 364 p.
- Furuita, H., H. Tanaka, T. Yamamoto, M. Shiraishi y T. Takeuchi.** 2000. Effects of n-3 HUFA levels in broodstock diet on the reproductive performance and egg and larval quality of the Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*. *Aquaculture*, 187: 387-398.
- Furuita, H., H. Tanaka, T. Yamamoto, M. Shiraishi y T. Takeuchi.** 2001. Effects of high dose of vitamin A on reproduction and egg quality of Japanese flounder *Paralichthys olivaceus*. *Fish. Sci.*, 67: 606-613.

- Furuita, H., H. Tanaka, T. Yamamoto, N. Suzuki y T. Takeuchi.** 2002. Effects of high levels of n-3 HUFA in broodstock diet on egg quality and egg fatty acid composition of Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*. *Aquaculture*, 210: 323–333.
- Furuita, H., T. Yamamoto, T. Shima, N. Suzuki y T. Takeuchi.** 2003. Effect of arachidonic acid levels in broodstock diet on larval and egg quality of Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*). *Aquac.* 220: 725-735.
- Furuita, H., H. Ohta, T. Unuma, H. Tanaka, H. Kagawa, N. Suzuki y T. Yamamoto.** 2003. Biochemical composition of eggs in relation to egg quality in the Japanese eel, *Anguilla japonica*. *Fish Physiol. Biochem.*, 29: 37-46.
- Furuita, H., T. Unuma, K. Nomura, H. Tanaka, K. Okuzawa, T. Sugita y T. Yamamoto.** 2006. Lipid and fatty acid composition of eggs producing larvae with high survival rate in the Japanese eel. *J. Fish Biol.*, 69: 1178-1189.
- Fushimi, H.** 2001. Production of juvenile marine finfish for stock enhancement in Japan. *Aquaculture*, 200: 33–53.
- Ganga, R., L. Tort, L. Acerete, D. Montero y M.S. Izquierdo.** 2006. Modulation of ACTH-induced cortisol release by polyunsaturated fatty acids in interrenal cells from gilthead seabream, *Sparus aurata*. *J. Endocrinol.*, 190:39-45.
- García-Ortega, A., I. Abdo y C. Hernández.** 2003. Weaning of bullseye puffer (*Sphoeroides annulatus*) from live food to microparticulate diets made with decapsulated cysts of *Artemia* and fishmeal. *Aquacult. Int.*, 11:183-194.
- García-Ortega, A., I. Abdo-De la Parra, N. Duncan, E. Rodríguez-Ibarra, G. Velasco, B. González-Rodríguez, A. Puello-Cruz e I. Martínez.** 2005. Larval rearing of spotted rose snapper *Lutjanus guttatus* under experimental conditions, 172-175. *En: Hendry C.I., G. Van Stapien, M. Wille y P. Soorgelos (Eds.) Larvi '05 – fish and shellfish larviculture symposium*, European Aquaculture Society, publicación especial no. 36, Oostende, Bélgica. 591 p.
- Genestra, I.** 2007. Oxyl radicals, redox-sensitive signalling cascades and antioxidants. *Cell. Sig.*, 19: 1807-1819.
- Goetz, F.W. y G. Theofan.** 1979. In vitro stimulation of germinal vesicle breakdown and ovulation of yellow perch (*Perca flavescens*) oocytes. Effects of 17 α -Hydroxy-20 β -dihydroprogesterone and prostaglandins. *Gen. Com. Endocr.* 37: 273-285.
- Goetz, F.W. y M. Grarczinsky.** 1997. The ovarian regulation of ovulation in teleost fish. *Fish Physiol. Biochem.*, 17: 33-38.
- Golumbic, C. y H.A. Mattill.** 1941. Antioxidants and the autoxidation of fats. XIII. The antioxygenic action of ascorbic acid in association with tocopherols, hydroquinones and related compounds. *J. Am.Chem.Soc.*, 63: 1279-1280.
- Gopala-Krishna, A.G., K.H. Hemakumar y S. Khatoon.** 2006. Study on the Composition of Rice Bran Oil and Its Higher Free Fatty Acids Value. *JAOCS*, 83: 117-120.
- Gracia-López, V., J. Rodríguez-Romero, J.M. Pérez-Ramírez.** 2004a. Hormone induced spawning (HCG), and embryonic and larval development of the leopard grouper, *Mycteroperca rosacea* (Streets, 1877). *Ciencias Marinas*, 30:279-284.
- Gracia-López, V., M. Kiewek-Martínez y M. Maldonado-García.** 2004b. Effects of temperature and salinity on artificially reproduced eggs and larvae of the leopard grouper *Mycteroperca rosacea*. *Aquaculture*, 237:485-498.
- Gracia-López, V., M. Kiewek-Martínez, M. Maldonado-García, P. Monsalvo-Spencer, G. Portillo-Clark, R. Civera-Cerecedo, M. Linares-Aranda, M. Robles-Mungaray, J.M. Mazón-Suástegui.** 2005. Larvae and juvenile production of the leopard grouper, *Mycteroperca rosacea* (Streets, 1877). *Aquac. Res.*, 36:110-112.
- Grayeb-Del Alamo, T.** 2001. *Efecto de la densidad en el crecimiento de la cabrilla arenera Paralabrax maculatofasciatus (Percoidei:Serranidae) cultivada en jaulas flotantes.* Tesis de Maestría. CICIMAR-IPN, La Paz, B. C. S., México. 119 p.
- Gunstone, F.D. y Herslőf, B.G.** 2000. *Lipid glossary 2.* The Oil Press. 237 p.
- Gurr, M.I. y J.L. Harwood.** 1991. *Lipid biochemistry.* Chapman and Hall. Gran Bretaña. 406 pp.
- Hagiwara, A., W.G. Gallardo, M. Assavaaree, T. Kotani y A.B. de Araujo.** 2001. Live food production in Japan: recent progress and future aspects. *Aquaculture*, 200: 111–127.

- Harel, M., A. Tandler, G. Kissil, G. Wm, Applebaum.** 1994. The kinetics of nutrient incorporation into body tissues of gilthead sea bream *S. aurata* females and subsequent effects on egg composition and egg quality. *Brit. J. Nut.* 72: 45-58.
- Hong, W. y Zhang, Q.** 2003. Review of captive bred species and fry production of marine fish in China. *Aquaculture*, 227: 305–318.
- Hovey, T.E. y L.G. Allen.** 2000. Reproductive patterns of six populations of the spotted sand bass *Paralabrax maculatofasciatus*, from Southern and Baja California. *Copeia*, 459-468 p.
- Iwama, G.K.** 1998. Stress in fish. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 851: 304-310.
- Izquierdo, M. S.** 1996. Review Article: essential fatty acid requirements of cultured marine fish larvae. *Aquaculture Nutrition*. 2: 183-191.
- Izquierdo, M. y Fernández-Palacios, H.** 1997. Nutritional requirements of marine fish larvae and broodstock. *En: Tacon A.G. J. y B. Basurco (Eds.) (Cahiers options Méditerranennes vol.2)*
- Izquierdo, M., H. Fernández-Palacios y A.G.J. Tacon.** 2001. Effect of broodstock nutrition on reproductive performance of fish. *Aquaculture*, 197: 25–42.
- Kalaimani, N., N. Chakravarthy, R. Shanmugham, A.R. Thirunavukkarasu, S.V. Alavandi y T.C. Santiago.** 2007. Anti-oxidant status in embryonic, post-hatch and larval stages of Asian seabass (*Lates calcarifer*). *Fish Physiol. Biochem.*, DOI 10.1007/s10695-007-9155-4.
- Kjørsvik, E.** 1994. Egg quality in wild and broodstock cod *Gadus morhua* L. *J. World Aquac. Soc.*, 25: 22-29.
- Kjørsvik, E. y S. Lønning.** 1983. Effects of egg quality on normal fertilization and early development of the cod, *Gadus morhua* L. *J. Fish Biol.*, 23: 1-3.
- Kjørsvik, E., K. Hoehne-Reitana y K.I. Reitan.** 2003. Egg and larval quality criteria as predictive measures for juvenile production in turbot (*Scophthalmus maximus* L.). *Aquaculture*, 227: 9–20.
- Komar, C., J.F. Turnbull, A. Roque, E. Fajer y N.J. Duncan.** 2004. Effect of water treatment and aeration on the percentage hatch of demersal, adhesive eggs of the bullseye puffer (*Sphoeroides annulatus*). *Aquaculture*, 229:147-158
- Lahnsteiner, F. y Patarnello, P.** 2003. Investigations on the metabolism of viable and nonviable gilthead sea bream (*Sparus aurata*) eggs. *Aquaculture*, 223: 159-174.
- Lahnsteiner, F. y Patarnello, P.** 2004. Biochemical egg quality determination in the gilthead seabream, *Sparus aurata*: Reproducibility of the method and its application for sharpnose seabream, *Puntazzo puntazzo*. *Aquaculture*, 237: 433-442.
- Lee, C.S. y A.C. Ostrowski.** 2001. Current status of marine finfish larviculture in the United States. *Aquaculture*, 200: 89–109.
- Lehninger, A.L.** 1982. Bioquímica: Las bases moleculares de la estructura y función celular. Ediciones Omega, S.A. España. pp
- Lluch-Cota, D.B.** 1995. *Aspectos reproductivos de la cabrilla arenera Paralabrax maculatofasciatus (Pisces: Serranidae) en Bahía Magdalena-Almejas, Baja California Sur, México.* Tesis de Maestría. CICIMAR-IPN. 116 p.
- Luquet, P. y Watanabe T.** 1986. Interaction “nutrition-reproduction” in fish. *Fish Physiol. Biochem.*, 2: 121-129.
- Mangor-Jensen, A. y J.C. Holm.** 1994. Effects of dietary vitamin C on maturation and egg quality of cod *Gadus morhua* L. *J. World Aquac. Soc.*, 25: 30-40.
- Marte, C.L.** 2003. Larviculture of marine species in Southeast Asia: current research and industry prospects. *Aquaculture*, 227: 293–304.
- Martínez-Álvarez, R.M., A.E. Morales y A. Sanz.** 2005. Antioxidant defenses in fish: Biotic and abiotic factors. *Rev. Fish Biol. Fish.*, 15: 75-88.

- Martínez-Brown, J.M.** 2007. Efecto del nivel de inclusión de ácidos grasos esenciales y proteína en el alimento de reproductores de cabrilla arenera *Paralabrax maculatofasciatus* (Percoidei: Serranidae) sobre la calidad de las primeras fases de vida. Tesis de Maestría, CICIMAR-IPN, La Paz, B.C.S., México. 99 p.
- Matus-Nivón, E., R. Ramírez-Sevilla, R. Martínez-Pecero y J.L. Ortiz-Galindo.** 1990. Potencial acuacultural de ocho especies de peces marinos del Pacífico mexicano, con base en su biología temprana, 67-74. En: De la Lanza-Espino, G. y Arredondo-Figueroa J.L. (Eds.) *La acuicultura en México: de los conceptos a la producción*. Instituto de Biología-UNAM.
- Mazorra, C., M. Bruce, J.G. Bell, A. Davie, E. Alorend, N. Jordan, J. Rees, N. Papanikos, M. Porter y N. Bromage.** 2003. Dietary lipid enhancement of broodstock reproductive performance and egg and larval quality in Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*). *Aquac.* 227:21-33.
- Mc Dougall, T.M. y G. Van Der Kraak.** 1998. Peptide growth factors modulate prostaglandin E and F production by goldfish ovarian follicles. *Gen. Comp. Endocr.*, 110: 46-57.
- Mendoza-Carranza, M. y J.A. Rosales-Casián.** 2000. The feeding habits of spotted sand bass (*Paralabrax maculatofasciatus*) in Punta Banda estuary, Ensenada, Baja California, México. *Calif. Coop. Ocean. Fish. Invest. Rep.*, 41: 194-200.
- Mercure, F. y G. Van Der Kraak.** 1996. Mechanisms of action of free arachidonic acid on ovarian steroid production in the goldfish. *Gen. Comp. Endocr.*, 102: 130-140.
- Miki, W., K. Yamaguchi, S. Konosu y T. Watanabe.** 1984. Metabolism of dietary carotenoids in eggs of red sea bream. *Comp. Biochem. Physiol.*, 77B: 665-668.
- Miller, E.F. y L.G. Allen.** 2006. Observations on the mating behavior of captive spotted sand bass (*Paralabrax maculatofasciatus*). *Bull. Southern California Acad. Sci.*, 105: 17-29.
- Mommsen, T.P. y P.J. Walsh.** 1988. Vitellogenesis and oocyte assembly, 347-406. En: Hoar W.S. y Randall D.J. (Eds.) *Fish Physiology Vol. 11*. Academic Press, California. 546 p.
- Mommsen, T.P., M.M. Vijayan y T.W. Moon.** 1999. Cortisol in teleosts: dynamics, mechanisms of action, and metabolic regulation. *Rev. Fish Biol. Fish.*, 9: 211-268.
- Moretti, A., P. Fernández-Criado, G. Cittolin y R. Guidiastri.** 1999. *Manual on the hatchery production of sea bass and gilthead seabream*. Vol. 1. FAO, Roma. 194 p.
- Mourente, G. y J.M. Odriozola.** 1990. Effect of broodstock diets on lipid classes and their fatty acid composition in eggs of gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.). *Fish Physiol. Biochem.*, 8: 93-101.
- Mourente, G., J.G. Bell y D.R. Tocher.** 2007. Does dietary tocopherol level affect fatty acid metabolism in fish?. *Fish. Physiol. Biochem.*, 33: 269-280.
- Mourente, G., A. Rodríguez, E. Grau y Pastor.** 1999. Utilization of lipids by *Dentex dentex* L. (Osteichthyes, Sparidae) larvae during lecithotrophy and subsequent starvation. *Fish Physiol. Biochem.*, 21: 45-58.
- Muhlia-Melo, A.J., J. Arvizu-Martínez, J. Rodríguez-Romero, D. Guerrero-Tortolero, F. Gutiérrez y A. Muhlia-Almazán.** 1994. *Desarrollo científico y tecnológico del cultivo de robalo*. SEPESCA-CIBNOR. 66 p.
- Navas, J.M., M. Bruce, M. Thrush, B. M. Farndale, N. Bromage, S. Zanuy, M. Carrillo, J. G. Bell y J. Ramos.** 1997. The impact of seasonal alteration in the lipid composition of broodstock diets on egg quality in the European sea bass. *J. Fish Biol.*, 51, 760-773.
- Nelson, J.S.** 2006. *Fishes of the world*. 4 ed. John Wiley y Sons. 600 p.
- Nissling, A., R. Larsson, L. Vallin y K. Frohland.** 1998. Assessment of egg and larval quality in cod, *Gadus morhua*: methods and results from an experimental study. *Fish. Res.*, 38: 169-186.
- Nocillado, J.N., V.D. Peñaflores y I.G. Borlongan.** 2000. Measures of egg quality in induced spawns of the Asian sea bass, *Lates calcarifer* Bloch. *Fish Physiol. Biochem.*, 22:1-9.
- Ocampo-Cervantes, J.A.** 2002. Desarrollo gonádico y actividad reproductiva de la cabrilla arenera *Paralabrax maculatofasciatus* (Teleostei: Serranidae), en La Bahía de la Paz, Baja California Sur. Tesis de Maestría. CICIMAR-IPN, La Paz, B.C.S., México. 78 p.

- Oda, D.L., R.J. Lavenberg y J.M. Rounds. 1993. Reproductive biology of three California species of *Paralabrax* (Pisces: Serranidae). *Calif. Coop. Ocean. Fish. Invest. Rep.*, 34: 122-132.
- Palace, V.P. y J. Werner. 2006. Vitamins A and E in the maternal diet influence eggs quality and early life stages development in fish: a review. *Sci. Mar.*, 70: 41-57.
- Panini, E.B., C.C. Mylonas, S. Zanuy, M. Carrillo, J. Ramos y M.P. Bruce. 2001. Incubation of embryos and larvae of marine fish using microtiter plates. *Aquacult. Int.* 9: 189-195.
- Patiño, R. y C.V. Sullivan. 2002. Ovarian follicle growth, maturation, and ovulation in teleost fish. *Fish Physiol Biochem.*, 26: 57-70.
- Peña, R. y S. Dumas. 2005. Effect of delayed first feeding on development and feeding ability of *Paralabrax maculatofasciatus* larvae. *J. Fish Biol.*, 67: 640-651.
- Peña, R., S. Dumas, A. Trasviña, G. García, y H. Pliego-Cortéz. 2005. Effects of tank colour and prey density on first feeding of the spotted sand bass *Paralabrax maculatofasciatus* (Steindachner) larvae. *Aquacult. Res.*, 36: 1239-1242.
- Peña, R., S. Dumas, M. Villalejo-Fuerte y J.L. Ortiz-Galindo. 2003. Ontogenetic development of the digestive tract in reared spotted sand bass *Paralabrax maculatofasciatus* larvae. *Aquaculture*, 219: 633-644.
- Peña, R., S. Dumas, R. Saldivar-Lucio, G. García, A. Trasviña y D. Hernández-Ceballos. 2004. The effect of light intensity on first feeding of the spotted sand bass *Paralabrax maculatofasciatus* (Steindachner) larvae. *Aquacult. Res.*, 35: 345-349.
- Pickova, J., P.C. Dutta, P. Larsson y A. Kiessling. 1997. Early embryonic cleavage pattern, hatching success, and egg-lipid fatty acid composition: comparison between tow cod (*Gadus morhua*) stock. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, 54: 2410-2416.
- Pickova, J., P.C. Dutta, A. Pettersson, L. Frøyland, A. Kiessling. 2003. Eggs of Baltic salmon displaying M74, yolk sac mortality syndrome have elevated levels of cholesterol oxides and the fatty acid 22:6 n-3. *Aquaculture*, 227: 63-75.
- Rainuzzo, J.R., K.I. Reitan, y Y. Olsen. 1997. The significance of lipids at early stages of marine fish: a review. *Aquaculture*, 115: 103-115.
- Reichenbach-Kilnke, H.H. 1982. *Enfermedades de los peces*. Acribia (Ed.), Zaragoza. 507 p.
- Rideout, R. M., E. A. Trippel y M. K. Litvak. 2004. Predicting haddock embryo viability based on early cleavage patterns. *Aquaculture*, 230: 215-228.
- Rodríguez-Trejo, M., V. Carrasco-Chávez, C.A. Alvarez-González, J.L. Ortiz-Galindo, R. Civera-Cerecedo, J.M. Martínez-Brown, M.O. Rosales-Velázquez, L. Carreon-Palau y T. Grayeb-Del Álamo. 2004. Variación en la concentración de ácidos grasos esenciales durante la ontogenia inicial de la cabrilla arenera *Paralabrax maculatofasciatus*, 146. En: *Resúmenes IX Congreso Nacional de Ictiología*. Villahermosa, Tabasco, México
- Rosales-Velázquez, M. O. 1997. *Efecto de la alimentación sobre los desoves de la cabrilla arenera Paralabrax maculatofasciatus (Teleostei: Serranidae) mantenida en cautiverio*. Tesis de Maestría. CICIMAR-IPN, La Paz, B.C.S., México. 62 p.
- Rosales-Velázquez, M.O., R.E. Martínez-Pecero, B. Anguas-Velez, M. Contreras-Olguín y O. Rodríguez-Morales. 1992. Inducción al desove de la cabrilla arenera *Paralabrax maculatofasciatus* (Steindachner) (Pisces: Serranidae) mantenida en laboratorio, 18. En: *Resúmenes III Congreso Nacional de Ictiología*. Oaxtepec, Mor., México.
- Salze, G., D.R. Tocher, W.J. Roy y D.A. Robertson. 2005. Egg quality determinants in cod (*Gadus morhua* L.): egg performance and lipids in eggs from farmed and wild broodstock. *Aquacult. Res.*, 36: 1488-1499.
- Sargent, J. 1995. Origins and functions of egg lipids: nutritional implications, 353-372. En: Bromage, N y Roberts, R. (Eds.) *Broodstock management and egg and larval quality*. Blackwell Science. 424 p.
- Sargent, J.R., T.R. Tocher y J.G. Bell. 2002. The lipids, 181-257. En: Halver, J.E. y R.W. Hardy (Eds.) *Fish Nutrition*. 3^{ra} ed. Academic Press. 500 p.
- Sargent, J.R., J.G. Bell, M.V. Bell, R.J. Henderson y D.R. Tocher. 1995. Requirements criteria for essential fatty acids. *J. Appl. Ichthyol.* 11: 183-198.

- Sargent, J., G. Bell, L. Mc Evoy, D. Tocher y A. Estevez.** 1999. Recent developments in the essential fatty acid nutrition of fish. *Aquaculture*, 177: 191–199.
- Sato, N. y N. Murata.** 1988. Membrane Lipids, 251-159. *En: Abelson J.N., M.I. Simon, y A.N. Glazer (Eds.) Methods of Enzymology Vol. 167.* Academic Press. 915 p.
- Schoenwolf, G. C.** 2001. Vertebrate and invertebrate embryos. 8th Ed. Prentice-Hall, N. J. U.S.A. 360 pp
- Shepherd, C.J.** 1988. What is fish farming?, 1-16. *En: Shepherd C.J. y N.R. Bromage (Eds.) Intensive Fish Farming.* BSP Professional Books. 404 p.
- Shields, R.J., N.P. Brown y N.R. Bromage.** 1997. Blastomere morphology as a predictive measure of fish egg viability. *Aquaculture*, 155: 1-12.
- Sokal, R. R. y J. Rohlf.** 1994. Biometry. W.H. Freeman and Company. New York. 859 pp.
- Sorbera, L.A., J.F Asturiano, M. Carrillo y S. Zanuy.** 2001. Effects of polyunsaturated fatty acids and prostaglandins on oocyte maturation in a marine teleost, the European sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Biol. Reprod.*, 64: 382-389.
- Sorensen , P.W.** 1992. Hormonally derived sex pheromones in goldfish: A model for understanding the evolution of sex pheromone systems in fish. *Biol. Bull.*, 183: 173-177.
- Sorensen, P.W. y N.E. Stacey.** 2004. Brief review of fish pheromones and discussion of their possible uses in the control of non-indigenous teleost fishes. *N. Z. J. Mar. Freshw. Res.*, 38: 399–417.
- Sorensen , P.W., T.J. Hara, N.E. Stacey, F.W. Goetz.** 1998. F prostaglandins function as potent stimulants that comprise the post-ovulatory female sex pheromone in goldfish. *Biol. Reprod.* 39: 1039-1050.
- Stacey, N.E. y F.W. Goetz.** 1982. Role of Prostaglandins in fish reproduction. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 39: 92-98.
- Strickland, J.D.H. y T.R. Parsons.** 1972. *A practical handbook of seawater analysis.* 2^{da} ed. Bull. 167. J. Fish. Res. Board Can. Ottawa. 310 p.
- Thomson, D.A., L.T. Findley y N. Kerstitch.** 2000. Reef fishes of the Sea of Cortez. The rocky shore fishes of the Gulf of California. The University of Texas Press. 535 p.
- Tocher, D.R.** 2003. Metabolism and functions of lipids and fatty acids in teleost fish. *Rev. Fish. Sci.*, 11: 107-184.
- Tovar-Ramírez, D., C.A. Alvarez-González, R. Civera-Cerecedo, V. Carrasco-Chávez, J.L. Ortíz-Galindo, V. Gleaves-López y J.N. Gutiérrez-Rivera.** 2005. Effect of dietary lipid levels on lipase activity on spotted sand bass *Paralabrax maculatofasciatus* juveniles, 530-533. *En: Hendry C.I., G. Van Stapien, M. Wille y P. Soorgelos (Eds). Larvi '05 – fish and shellfish larviculture symposium, European Aquaculture Society, publicación especial no. 36, Oostende, Bélgica.* 591 p.
- Tucker, J.W.** 1998. *Marine fish culture.* Kluwer Academic Publishers, Massachusetts, U.S.A. 750 p.
- Unuma, T., S. Kondo, H. Tanaka, H. Kagawa, K. Nomura y H. Ohta.** 2004. Determination of the rates of fertilization, hatching and larval survival in the Japanese eel, *Anguilla japonica*, using tissue culture microplates. *Aquaculture*, 241: 345-356.
- Vallin, L. y A. Nissling.** 1998. Cell morphology as an indicator of viability of cod egg – results from an experimental study. *Fish. Res.*, 38: 247-255.
- Van Der Kraak, G. y J.P. Chang.** 1990. Arachidonic acid stimulates steroidogenesis in goldfish preovulatory ovarian follicles. *Gen. Comp. Endocr.*, 77: 221-228.
- Varsamos, S., C. Nebel y G. Charmantier.** 2005. Ontogeny of osmoregulation in postembryonic fish: a review. *Comp. Biochem. Physiol.*, A, 141: 401-429.
- Vassallo-Agius, R., T. Watanabe, H. Imaizumi y T. Yamazaki.** 2002. Spawning performance of yellowtail *Seriola quinqueradiata* fed dry pellets containing paprika and squid meal. *Fish. Sci.*, 68: 230-232.
- Vassallo-Agius, R., H. Imaizumi, T. Watanabe, T. Yamazaki, S. Satoh y V. Kiron.** 2001a. The influence of astaxanthin supplemented dry pellets on spawning of striped jack. *Fish. Sci.*, 67: 260-270.

- Vassallo-Agius, R., T. Watanabe, H. Imaizumi, T. Yamazaki, S. Satoh y V. Kiron.** 2001b. Effects of dry pellets containing astaxanthin and squid meal on the spawning performance of striped jack *Pseudocaranx dentex*. *Fish. Sci.*, 67: 667-674.
- Vassallo-Agius, R., T. Watanabe, S. Satoh, V. Kiron, H. Imaizumi, T. Yamazaki y K. Kawano.** 2001c. Supplementation of paprika as a carotenoid source in soft-dry pellets for broodstock yellowtail *Seriola quinqueradiata* (Temminck & Schlegel). *Aquac. Res.*, 32: 263-272
- Watanabe, T.** 1985. Importance of the study of broodstock nutrition for further development of aquaculture, 395-414. *En: cowey, C.B., A.M.Mackie y J.G. Bell (Eds.) Nutrition and feeding in fishes.* Academic Press. Faltan paginas.
- Watanabe, T.** 1993. Importance of docosahexaenoic acid in marine larval fish. *Journal of the World Aquaculture Society.* 24:152-161.
- Watanabe, T. y V. Kiron.** 1995. Red sea bream (*Pagrus major*). *En: Bromage, N y Roberts, R. (Eds.) Broodstock management and egg and larval quality.* Blackwell Science. 424 p.
- Watanabe, T. y R. Vassallo-Angius.** 2003. Broodstock nutrition research on marine finfish in Japan. *Aquaculture*, 227: 35-61.
- Watanabe, T., Kitajima, C. y S. Fujita.** 1983. Nutritional values of live organisms used in Japan for mass propagation of fish: a review. *Aquaculture*, 34: 115-143.
- Watanabe, T., T. Koizumi, H. Suzuki, S. Satoh, T. Takeuchi, N. Yoshida, T. Kitada e Y. Tsukashima.** 1985. Improvement of quality of red sea bream eggs by feeding broodstock on a diet containing cuttlefish meal or on raw krill shortly before spawning. *Bull. Jap. Soc. Sci.*, 51: 1511-1521.
- Westernhagen, H.** 1998. Sublethal effects of pollutants on fish egg, 253-347. *En: Hoar W.S. y Randall D.J. (Ed.) Fish Physiology Vol. 11.* Academic Press. 546 p.
- Wiegand, M.D.** 1996. Composition, accumulation and utilization of yolk lipids in teleost fish. *Rev. Fish Biol. Fish.*, 6: 259-286.
- Yamagami, K.** 1981. Mechanisms of hatching in fish: Secretion of hatching enzyme and enzymatic choriolysis. *Amer. Zool.*, 21: 459-471.
- Zar, J.H.** 1996. Biostatistical analysis. 3rd. Ed. Prentice-Hall, N.J. U.S.A. 718 pp.