Programa de Estudios de Posgrado

ESTIMACIÓN DEL INICIO DE LA PUBERTAD EN JUVENILES DE Lutjanus peru NACIDOS EN CAUTIVERIO Y LOS EFECTOS DEL MANEJO NUTRICIONAL SOBRE LA CALIDAD DE LOS DESOVES.

TESIS

Que para obtener el grado de

Doctor en Ciencias

Uso, Manejo y Preservación de los Recursos Naturales (Orientación Acuicultura)

Presenta

Milton Alejandro Spanopoulos Zarco

La Paz Baja California Sur, febrero de 2017

ACTA DE LIBERACIÓN DE TESIS

En la Ciudad de La Paz, B. C. S., siendo las 12 horas del día 8 del Mes de Febrero del 2016, se procedió por los abajo firmantes, miembros de la Comisión Revisora de Tesis avalada por la Dirección de Estudios de Posgrado y Formación de Recursos Humanos del Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S. C., a liberar la Tesis de Grado titulada:

"ESTIMACIÓN DEL INICIO DE LA PUBERTAD EN JUVENILES DE Lutjanus peru NACIDOS EN CAUTIVERIO Y LOS EFECTOS DEL MANEJO NUTRICIONAL SOBRE LA CALIDAD DE LOS DESOVES."

Presentada por el alumno:

Milton Alejandro Spanopoulos Zarco

Aspirante al Grado de DOCTOR EN CIENCIAS EN EL USO, MANEJO Y PRESERVACIÓN DE LOS RECURSOS NATURALES CON ORIENTACIÓN EN Acuicultura

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

A COMISIÓN REVISORA

Dra. Minerva Concepción Maldonado García Co-Director

Dr. Felipe de Jesús Ascencio Valle Co-Director

Dr. Juan Carlos Pérez Urbiola

Co-Tutor

Dr. José Antonio Estrada Godinez

Co-Tutor

Dr. Manuel Carrillo Estévez

Co-Tutor

Dra. Norma Yolanda Hernández Saavedra. Directora de Estudios de Posgrado y

Formación de Recursos Humanos

Comité Tutorial.

Dra. Minerva Maldonado García, Co-Director de tesis CIBNOR, La Paz, B.C.S México
Dr. Felipe de Jesús Ascencio Valle, Co-Director de tesis CIBNOR, La Paz, B.C.S México
Dr. Juan Carlos Pérez Urbiola, Co-Tutor CIBNOR, La Paz, B.C.S México
Dr. José Antonio Estrada Godínez, Co-Tutor UAS, Mazatlán Sin. México
Dr. Manuel Carrillo Estévez, Co-Tutor IATS, Catellón, España

Comité Revisor de Tesis.

Dra. Minerva Maldonado García

Dr. Felipe de Jesús Ascencio Valle

Dr. Juan Carlos Pérez Urbiola

Dr. José Antonio Estrada Godínez

Dr. Manuel Carrillo Estévez

Jurado de Examen de Grado.

Dra. Minerva Maldonado García

Dr. Felipe de Jesús Ascencio Valle

Dr. Juan Carlos Pérez Urbiola

Dr. José Antonio Estrada Godínez

Dr. Manuel Carrillo Estévez

Suplentes

Dr. Vicente Gracia López Dr. Francisco Magallón Barajas

Resumen

El éxito del proceso reproductivo de peces marinos, está determinado principalmente por la manipulación de los organismos, su condición nutricional, así como las condiciones ambientales y las técnicas de inducción al desove. El huachinango del Pacífico, Lutjanus peru, es una especie atractiva para la acuicultura. Sin embargo, su reproducción en cautiverio no había sido factible, debido a la falta de conocimiento sobre los requerimientos alimenticios, las condiciones de manejo y el proceso reproductivo. En el Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste (CIBNOR), tras seis años de mantenimiento de reproductores silvestres de L. peru, se lograron los primeros desoves en cautiverio de manera natural con sincronización de la puesta entre hembras y machos, es decir, sin la aplicación de hormonas y bajo las condiciones ambientales de temperatura y fotoperiodo existentes en el lugar (24°08'N, 110°25'W). Esta primer generación (F1) abrió la posibilidad de evaluar con precisión por primera vez la edad de primera madurez de la especie; así como los efectos que produce durante la reproducción la implementación de distintas dietas, ya que son peces que se adaptan con facilidad a dietas fabricadas. La primera madurez se presentó a los 4 años de edad, con un peso promedio de $2,829 \pm 80.9$ g y talla promedio de 540.3 ± 4.6 mm. Los primeros desoves sucedieron en el mes de junio del 2013, con la sincronización reproductiva entre los machos y las hembras en cautiverio, esto coincidió cuando el fotoperiodo fue de 13 horas luz y 11 de obscuridad, a un aumento de temperatura del agua del tanque de 24.81 ± 1.4 °C, y finalizando los desoves el mes de diciembre, con un decremento de temperatura a 21.2 ± 1.5 °C y a 10 horas luz y 14 horas de obscuridad. Previo a la madurez sexual, se evaluaron los niveles hormonales (estradiol, testosterona y 11-keto-testosterona) encontrando un aumento en las concentraciones antes del inicio de la temporada reproductiva. La implementación de una dieta experimental con una microalga (Gramatophora sp.) a los reproductores, avuda a elevar significativamente (P<0.05) los porcentajes de eclosión de las puestas, además permitió mantener sin fluctuaciones los valores en los porcentajes de eclosión durante toda la temporada, mientras que los peces de la dieta sin suplementar, presentan porcentajes de eclosión significativamente menores (P<0.05); además, se observó que la variación de tamaño del huevo entre los tratamientos durante el experimento; donde el tamaño del huevo de los peces sometidos a la dieta adicionada con la microalga, resulta mayor; además de no presentar variaciones significativas durante toda la temporada de desoves; lo que demuestra, la posibilidad de modular el proceso reproductivo, aumentando el tamaño de los huevos y los porcentajes de eclosión de esta especie a través de la dieta.

Palabras Clave: Primera madurez, desempeño reproductivo, calidad de huevos, *Lutjanus peru*.

	Vo. Bo.	
Dra. Minerva Maldonado García		Dr. Felipe Ascencio Valle
Co-Director		Co-Director

Summary

The success of the reproductive process of marine fish is mainly determined by manipulations of the organisms, their nutritional status, as well as environmental conditions and techniques of spawning induction. The Pacific red snapper, Lutjanus peru, is an attractive species for aquaculture. However, their reproduction in captivity has been not feasible, due to lack of knowledge about nutritional requirements, management conditions and reproductive process. At Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste (CIBNOR), the first natural spawning events were achieved without hormonal applications and under local conditions of temperature and photoperiod (24°08'N, 110°25'W) after six years of maintenance of wild brood stock of L. peru, This first generation (F1) opened the opportunity to assess the first maturation age in this species and the effects of different diets on their reproduction, because the Pacific red snapper is a fish with easy adaptation to artificial diets. The first maturation was at four years old with an average weight of $2,829 \pm$ 80.9 g and size of 540.3 ± 4.6 mm of total length. The first spawning event were observed in June 2013, with synchronization of female and male in captivity conditions; when the daylength was 13 hours and temperature of 24.81 ± 1.4 °C, while December was the last month of spawning, when the photoperiod and the temperature decreased (daylength of 10 hrs. and 21.2 ± 1.5 °C of temperature). Hormonal levels (estradiol, testosterone and 11ketotestosterone) were measured prior to sexual maturity, recording an increment in the concentrations of these hormones next before the beginning of the spawning season. Implementation of a diet supplemented with microalgae (Gramatophora sp.) to the Pacific red snapper boodstock, increase significantly the hatching rate (P < 0.05), but without significant variations of this parameter during whole spawning season, while the fishes fed with the control diet (without microalgae) had significant lower hatching rates (P<0.05). Significant differences in eggs diameter was observed, being higher in fishes fed with the experimental diet (supplemented with microalgae) and without significant variations throughout the spawning season. According the obtained results we can conclude that improvements in the reproductive process are possible, increasing the egg diameter and the hatching rates by the management of diets

Keywords: First maturity, reproductive performance, egg quality, *Lutjanus peru*.

	Vo. Bo.	
Dra. Minerva Maldonado García		Dr. Felipe Ascencio Valle
Co-Director		Co-Director

Dedicatoria.

Reparto <u>casi</u> equitativamente el mérito de este logro a todos y cada uno de quienes por convicción u obligación me acompañaron durante todo este tiempo; pero sería injusta tal proporcionalidad para quienes son piezas clave a la hora de asignar responsabilidades. Mis padres, de quienes recibí los ejemplos idóneos (buenos y malos) mis hermanas que de pequeño me defendían y ahora me enseñan a defenderme cuando de química y veterinaria se trata, a los 5 sobrinos que me dieron, los que me recuerdan que es mejor seguir siendo niño. Mi otra mamá, Alli quien vio de cerca cuando empecé y ahora que esto culmina me ve de un poquito más arriba y mis otras hermanas Geo y Cris (y el enano) por que han estado a mi lado siempre; a mi nueva familia, Nurens.

La repartición también es inequitativa para mis amigos más leales, Lalo, Mely, Ely, la otra Eli, Matus, Itzel, Rosy, José Antonio, Coi, Nurens. Mis buzos de seguridad, con quienes puedo contar cuando andamos sumergidos Antonio, Rommel, Rafa, Memo, Martin, Nurens, que cuando empecé con el doctorado, hablábamos de este día como un día muy muy lejano.

Finalmente a Nurens... La misma Nurens que parece en familia, en amigos leales y en buzos de seguridad, por que sin duda, esto no hubiera tenido el mismo desenlace de no haberte conocido a mitad del camino, porque eres ahora mi socia comercial, mi terapeuta, asistente personal, un ejemplo académico y seguramente, mi cómplice en todos los planes y retos que a partir de ahora comienzan.

Agradecimientos.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), por su apoyo para la realización de los estudios del Doctorado, a través de la Beca Nacional N°46904

Al Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste S. C. (CIBNOR), por recibirme todos estos años en sus instalaciones sin tener queja alguna sobre las oportunidades que otorga a sus estudiantes.

A la Dra. Minerva Maldonado García, por guiarme y brindarme su apoyo desde que llegue a realizar mi servicio social y 7 años después poder al fin culminar lo que muchas veces discutimos y parecía tan lejano.

A los miembros de mi comité al Dr. José Antonio Estrada Godínez, Dr. Felipe Ascencio Valle, Dr. Juan Carlos Pérez Urbiola, y el Dr. Manuel carrillo (IATS, Catellón, España), por apoyarme en todo momento cuando los problemas surgían.

A los técnicos encargados del Laboratorio Experimental en Reproducción de Organismos Acuáticos y patio de cultivo, Dr. Marcos Quiñones Arreola, Lic. Francisco Encarnación Ramírez, Biol. Jorge Sandoval Soto. M. C. Roxana Inohuye Rivera y M.C. José Gilberto Colado Duran que sin su apoyo en el cuidado y mantenimiento de los peces, simplemente todo esto no hubiera sido posible.

A los técnicos de cada laboratorio participante en la realización de este trabajo, M.C. Roberto Hernández Herrera, del Laboratorio de Bioquímica Fisiológica por el procesamiento de análisis bioquímicos y hormonales; Dra. Carmen Rodríguez Jaramillo del Laboratorio de Histología e Histoquímica por su ayuda en el procesamiento de las imágenes de huevos y larvas, M. C. Patricia Hinojosa Baltazar del Laboratorio de Fisiología Comparada por su ayuda en el procesamientos del plasma de los peces, al M. C. René Rebollar Prudente, por su apoyo incondicional en bioensayos y procesamiento de las muestras, al Lic. Aldo Vargas Mendieta, por el registro fotográfico durante las biometrías, y el apoyo con el procesamiento de imágenes.

A los miembros del taller de maquinados Jorge Cobos Anaya, Efraín Castillejos Pastrana, por el apoyo durante casi cualquier contingencia con equipos y reparaciones en los sistemas de cultivo.

Al personal del Programa de estudios de Posgrado del CIBNOR, Lic. Leticia González Rubio, Lic. Osvelia Ibarra Morales, Tania Núñez Valdez, Lupita Sánchez, Claudia Olachea y Horacio Sandoval Gómez, por su gran apoyo en todos los trámites, la paciencia y el buen humor con el que siempre me atendieron a pesar de los retrasos.

A los compañeros de generación, de los viernes de tocho y de las mismas desgracias, gracias por hacer más venidero los momentos de mucho estrés.

Contenido.

Resumen	i
Summary	ii
Dedicatoria	iii
Agradecimientos	i
Contenido	
Lista de figuras	vi
Lista de tablas	i
Abreviaturas	X
1. INTRODUCCIÓN	•••••
2. ANTECEDENTES	
2.1 Calidad de los desoves	
2.2 Control del desarrollo gonadal	
2.3 Gametogénesis	8
2.3.1 Ovogénesis	8
2.3.2 Espermatogénesis	
2.4 Pubertad en teleósteos	10
2.5 Inmunología reproductiva	12
2.6 Manejo Nutricional	14
2.7 Ácidos grasos y eicosanoides	10
2.8 Microalgas como fuente de enriquecimiento	18
3. JUSTIFICACIÓN	20
4. HIPÓTESIS	21
5. OBJETIVOS	22
5.1 Objetivo general.	22

5.2 Objetivos particulares	22
6. MATERIALES Y MÉTODOS	23
6.1 Obtención y mantenimiento de organismos	23
6.2 Crecimiento y evaluación de la maduración	23
6.3 Fabricación de las dietas	24
6.4 Diseño experimental del bioensayo	24
6.5 Obtención de desoves y evaluación de la calidad de los huevos	25
6.6 Niveles hormonales	27
6.7 Análisis estadísticos	27
7. RESULTADOS	.28
7.1 Primera madurez	28
7.2 Manejo nutricional	34
8. DISCUSIÓN	39
8.1 Primera madurez	39
8.2 Manejo nutricional	43
9. CONCLUSIONES	48
10. LITERATURA CITADA	49
11. ANEXOS	61

Lista de figuras.

Figura 1. Juvenil de huachinango del pacifico (<i>L. peru</i>) nacido en el CIBNOR4
Figura 2. Enlaces neuro-endocrinos del eje hipotálamo-hipófisis-gónada. GnRH hormona liberadora de gonadotropina, GRIF factor inhibidor de la liberación de gonadotropina11
Figura 3. Esquema de inmunonutrición y el cuidado de la salud
Figura 4. Síntesis y funciones agregantes e inflamatorias de los eicosanoides derivados del ácido araquidónico
Figura 5. Mediciones biométricas realizadas a huevos de <i>L. peru</i> . DGL= Diámetro de la gota lipídica; DH = Diámetro del huevo
Figura 6. Ganancia en peso y talla de <i>L. peru</i> nacidos en cautiverio en el CIBNOR, las distintas letras, indican las diferencias significativas (P <0.05) entre cada muestreo, donde PS = Presencia de semen y PM = Primara madurez, en el eje X se indica el mes y el año en el que se realizó cada biometría
Figura 7. Variación mensual en la temperatura del agua y en el fotoperiodo de los estanques del laboratorio húmedo del CIBNOR, las líneas punteadas, indican el inicio y final de los desoves en 2013. Las distintas letras indican las diferencias significativas (P <0.05) entre las temperaturas registradas. 30
Figura 8. Volumen y porcentaje de eclosión de huevos obtenidos de los desoves naturales de <i>L. peru</i> nacidos en cautiverio en 2013, las diferentes letras, indican las diferencias significativas (P <0.05) entre los porcentajes de eclosión de cada mes
Figura 9 . Diámetro de los huevos y de la gota lipídica de los desoves obtenidos en 2013 de <i>L. peru</i> nacidos en cautiverio en las instalaciones del laboratorio húmedo del CIBNOR, las diferentes letras, indican las diferencias significativas (P <0.05) entre cada mes.
Figura 10. Valores bioquímicos de huevos de juveniles de huachinango <i>L. peru</i> , nacidos en las instalaciones del laboratorio húmedo del CIBNOR en 2009, las diferencias letras indican las diferencias significativas (P <0.05) de las concentraciones entre cada mes.
Figura 11. Niveles hormonales en plasma en juveniles de huachinango L. peru, nacidos en

Figura 12. Desoves naturales de huachinangos del pacífico, obtenido en 2014 de dos tanques sometidos a una dieta experimental (R1) y una dieta control (R3), las diferentes letras, indican las diferencias significativas (P<0.05) entre los porcentajes de eclosión
Figura 13. Promedios ± error estándar del tamaño de huevo y de gota lipídica de huevos obtenidos de peces sometidos a una dieta experimental (R1) y a una dieta control (R3), las diferentes letras, indican las diferencias significativas (P <0.05) entre el tamaño del huevo y de la gota lipídica

Lista de tablas.

Tabla I. Efecto (estimulador +, e inhibidor -) de diferentes hormonas sobre la respuesta
inmunitaria en peces teleósteos. GH=Hormona del crecimiento, 11-KT = 11-
Ketotestosterona, MSH = Hormona estimulante de melanocitos, MCH = Hormona
concentradora de melanina
Tabla II. Análisis proximales de 4 parámetros de los ingredientes y la dieta completas
Tabla III. Perfil de ácidos grasos de los huevos obtenidos de peces sometidos a una dieta
experimental (R1) y una dieta control (R3)

Abreviaturas.

CIBNOR Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S. C.

CONACyT Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología FAO Organización de alimentos y agricultura

PUFAs Ácidos grasos poliinsaturados EPA Ácido eicosapentaenoico ARA Ácido araquidonico DHA Ácido docosahexaenoico

GtH Gonadotrofinas

GtRH Hormona liberadora de gonadotrofina HCG Gonadotrofina coriónica humana ARNm Ácido ribonucleico mensajero

μm Micrómetro

LHRH Hormona liberadora de hormona leutinizante

LH Hormona leutinizante

FSH Hormona folículo estimulante BPG Cerebro-hipófisis-gónada

E2 Estrógenos

EFA Ácidos grasos esenciales

HUFAs Ácidos grasos altamente insaturados

mm Milímetros mg Miligramos mL Mililitros

EFA Ácidos grasos esenciales

1. INTRODUCCIÓN.

La pesca y la acuicultura a nivel global, tiene un impacto directo en la economía mundial, la acuicultura sigue siendo hoy en día, la actividad pecuaria de mayor crecimiento; ha pasado de ser casi insignificante a equipararse totalmente con la producción de la pesca de captura. Este sector ha evolucionado respecto a la innovación tecnológica y la adaptación que satisface las necesidades cambiantes del mercado y de la regulación pecuaria. El sector da empleo a miles de personas en el mundo y es la base de los medios de vida de millones más (FAO, 2012)

Actualmente, se cultivan 600 especies acuáticas en todo el mundo en diversos sistemas e instalaciones de cultivo de diferentes grados de utilización de insumos y complejidad tecnológica, logrando mantener una tasa anual de crecimiento de entre 9.5 y 10.8% (FAO, 2012). No obstante, aún son muchas las exigencias para la domesticación de peces marinos y el establecimiento de una industria acuícola sustentable, capaz de controlar los procesos reproductivos de estos; hoy en día, la mayoría de la industria piscícola, depende completamente de la captura de juveniles o adultos del medio silvestre, presionando fuertemente al ecosistema, además de traducirse en una incertidumbre sobre la disponibilidad de organismos, así como una comprometida rentabilidad como industria (Mylonas *et al.*, 2010).

El éxito de este proceso reproductivo de peces marinos, está determinado principalmente por la manipulación de los organismos, su condición nutricional, así como las condiciones ambientales (calidad de agua y condiciones del sitio) y las técnicas de inducción al desove. Estos factores, están íntimamente relacionados unos con otros, de tal modo que unos pueden afectar a los otros hasta el grado de retrasar o evitar el proceso reproductivo o afectando fuertemente el logro de una progenie de calidad (Alvarez-Lajonchére, 2006). No existe un criterio único que defina la calidad de los desoves o el desempeño reproductivo de los peces, sin embargo, existe un consenso generalizado para valorarlo, mediante la cuantificación de parámetros zootécnicos como el tamaño de los huevos, de la gota lipídica,

la fecundidad, cantidad y frecuencia de los desoves, volúmenes de desove, duración de la temporada reproductiva, porcentaje de eclosión y porcentajes de supervivencia a la primera alimentación (Ali y Wootton, 1999; Emata, 2003; Mylonas *et al.*, 2004). Dicha calidad, de los desoves, se define como el potencial de un huevo a eclosionar y convertirse en una larva viable (Kjorsvik *et al.*, 1990; Brooks *et al.*, 1997); ésta depende completamente de la condición nutricional y de salud de los reproductores (Chevassus-au-Louis y Lazard, 2009), por lo que el manejo nutricional de los organismos, puede ser la clave para el desarrollo de una acuicultura sostenible; de éste, depende la posibilidad de controlar en mayor o menor medida cada uno de los factores que implica el proceso reproductivo. Izquierdo *et al.* (2001) y Sargent *et al.* (2002) coinciden en la importancia de una formulación adecuada de micro y macronutrientes para asegurar un óptimo desarrollo en los reproductores que garantiza niveles apropiados de inmunidad, crecimiento y una adecuada transferencia de nutrientes de la hembra a la progenie.

Recientemente, los esfuerzos en la acuicultura, se han centrado en la implementación de dietas, que busquen no solamente maximizar el crecimiento de los reproductores, sino también a través de esta, incrementar la tolerancia al estrés y fortalecer el sistema inmunológico que potencialicen la reproducción en cautiverio (Trichet, 2010). Para ello, se ha buscado la implementación de sustancias, que tengan un efecto benéfico sobre el sistema inmunitario cuando se suministra a determinadas dosis y aunque estrictamente no son consideradas como inmunoestimulantes, por no actuar directamente sobre los componentes del sistema inmunitario, su uso, ayuda a que éste funcione correctamente (Lamas-Fernandez, 2008). Al respecto, las microalgas han surgido como una fuente natural de tales sustancias de alto valor biológico como los ácidos grasos poliinsaturados, proteínas, pigmentos, antioxidantes, vitaminas y minerales, ficocoloides; además que como fotoautótrofos, sus requisitos de crecimiento son simples, convirtiendo a estos organismos atractivos para los bioprocesos dirigidos a la producción de alimentos y en el mercado farmacéutico (Guedes et al., 2011). En un estudio realizado por Pacheco-Vega et al. (2014), se aislaron y evaluaron como alimento potencial 5 cepas de microalgas de la Bahía de La Paz Baja California Sur México, encontrando que la cepa Grammatophora sp. presentó la mayor proporción de ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs), lo que la convierte en una especie interesante de ser evaluada.

En general, los pargos (Familia Lutjanidae) son muy valorados como alimento, logrando elevados precios en los mercados de todo el mundo. Varias especies de pargo son comercialmente cultivados en jaulas flotantes y lagunas costeras, sobre todo en Asia, con una producción total de 7302 t en 2010 (FAO, 2012). En específico, el huachinango del Pacifico (*Lutjanus peru*), especie objetivo de esta investigación, no se ha logrado reproducir con éxito en cautiverio; si bien los esfuerzos suman ya varios años para lograr su reproducción, los elevados costos de mantenimiento y bajos volúmenes de producción, evidencian la falta de conocimiento en los requerimientos óptimos para su desarrollo en cautiverio.

En el Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S. C. (CIBNOR), en La Paz, B.C.S., México, logró por primera vez la reproducción en cautiverio de esta especie, lo que abre la oportunidad explorar en aspectos básicos sobre fisiología reproductiva de esta especie.

2. ANTECEDENTES.

El huachinango del Pacifico (Fig. 1), es un pez demersal que se distribuye a todo lo largo del Pacífico Mexicano y es de suma importancia para la pesquería ribereña del país; en México, se captura durante todo el año, en especial de abril a agosto, cuando es más abundante. Sin embargo, entre 1992 y 2008, su extracción disminuyó significativamente (Garduño-Dionate *et al.*, 2010).

Algunos estudios, revelan que los huachinangos son depredadores activos, generalistas y carnívoro-oportunistas, que basa su alimentación en invertebrados bentónicos principalmente, aunque otros peces forman parte importante de su dieta (Santa-Miranda, 1998). Durante su etapa juvenil, habita estuarios y bocas de ríos formando escuelas; alcanzando la madurez migran a arrecifes rocosos y vive en pequeños grupos entre 80 y

100 metros de profundidad (Sheaves 1995; Madrid y Sánchez 1997; Allen y Robertson 1998; Arellano *et al.*, 2001; Piñón, 2003). Es una especie de hábitos nocturnos que prefiere zonas tropicales, donde las variaciones climáticas son mínimas; presenta reproducción asincrónica con desoves parciales y sus patrones reproductivos varían en función del tamaño de la población y su distribución (Arellano *et al.*, 2001).



Figura 1. Juvenil de huachinango del Pacifico (*L. peru*) nacido en el CIBNOR.

La mayoría de los estudios sobre ésta especie, abordan aspectos biológico-pesqueros, como edad y crecimiento (Caicedo *et al.*, 2006), alimentación (Saucedo-Lozano, 2000), madurez sexual (Santamaría-Miranda, 1998), distribución y abundancia (Saucedo-Lozano *et al.*, 1998). Sin embargo, en los últimos 10 años, nuevas líneas de investigación, han profundizado en el desarrollo de tecnologías de cultivo específico para ésta especie, logrando hasta el momento, generar protocolos de reproducción e incubación de huevos en cautiverio (Dumas *et al.*, 2004; Pelcastre-Campos, 2006; Zavala-Leal, 2007; García-Hurtado, 2008; Moreno-Figueroa, 2011; Guzmán-Villanueva, 2014). Paralelamente, se han

realizado estudios sobre crioconservación de gametos (Pelcastre-Campos, 2006), el efecto de la temperatura en el desarrollo embrionario y la eficiencia de la alimentación endógena en las larvas, así como la evaluación del efecto de la intensidad de luz, densidad y tipo de presas en la primera alimentación (Zavala-Leal, 2007). A pesar de éstos avances, se han registrado altas tasas de mortalidad durante los primeros días de desarrollo del huachinango del Pacífico, superiores al 95%. Esto puede atribuirse, entre otros motivos, a la mala calidad de los desoves obtenidos.

2.1 Calidad de los desoves.

Si bien para desarrollar cualquier cultivo de peces, es necesario el control de calidad de los huevos, cuando se trata de una nueva especie que ha sido recientemente introducida en la acuicultura es aún más importante obtener huevos de excelente calidad (Lahnsteiner y Patarnello, 2004); la calidad del huevo se define como el potencial de un huevo a eclosionar y convertirse en una larva viable (Kjorsvik *et al.*, 1990; Brooks *et al.*, 1997). Dicha calidad de los huevos puede verse afectada por edad de la madre y el factor de condición, el momento del ciclo del desove, los procesos de sobre maduración, factores genéticos, y también por las propiedades intrínsecas del huevo. Así mismo, la composición de las dietas de reproductores tiene una gran influencia tanto en el ciclo reproductivo como en la calidad de los huevos obtenidos (Brooks *et al.*, 1997).

Los estimadores de calidad de huevos, juegan un papel vital tanto en el ámbito de la investigación como en la producción (Chevassus-au-Louis y Lazard, 2009); a pesar de eso, y de los numerosos esfuerzos para evaluar los criterios de calidad de los huevos de peces, no se ha logrado un acuerdo entre los investigadores para definir un criterio de evaluación único; normalmente, la tasa de fertilización y eclosión son los indicadores más utilizados, así mismo, se evalúa la morfología, flotabilidad, el tamaño del huevo, la distribución de la gota lipídica y la morfología anormal de blastómeros como indicadores fiables de la calidad de los huevos (Unuma *et al.*, 2005; Mansour *et al.*, 2008; Aristizabal *et al.*, 2009; Kohn y Symonds, 2012). Los parámetros bioquímicos (proteína, lípidos, carbohidratos, aminoácidos, vitaminas y enzimas) también han sido considerados como indicadores de

calidad (Giménez *et al.*, 2006; Faulk y Holt, 2008; Lubzens *et al.*, 2010; Samaee *et al.*, 2010; Lanes *et al.*, 2012). Sin embargo, la precisión de estos mecanismos sigue siendo insuficiente, por ello, se debe realizar un análisis para descifrar la causa de la mala calidad de los gametos (Bobe y Labbe, 2010).

Recientemente, se ha incursionado en la utilización de herramientas moleculares como una alternativa que permite evaluar la calidad de los huevos, de especies de importancia comercial; logrando identificar 30 genes asociados con el potencial de desarrollo de los huevos, de los cuales al menos 5 genes están involucrados en la regulación de la transcripción, mientras que el resto en la proliferación celular y la organización del cito esqueleto y la biogénesis (Bonnet *et al.*, 2007; Mommens *et al.*, 2010; Segers *et al.*, 2012).

La posibilidad de obtener huevos de buena calidad, es uno de los mayores retos a los que se enfrentan los acuicultores; la reproducción de peces puede ser controlada por medio de la manipulación del ambiente, como el fotoperiodo, temperatura del agua o sustratos para los desoves. Sin embargo, la biología de la mayoría de las especies no se conoce bien, o no es práctico o incluso imposible de controlar en cautiverio los parámetros ambientales propios de la especie. Para estos casos, se ha incursionado en el uso de hormonas exógenas para inducir la maduración de peces marinos (Asturiano *et al.*, 2000; Agulleiro *et al.*, 2006; Mylonas *et al.*, 2010; Dumas *et al.*, 2004).

2.2 Control del desarrollo gonadal.

El manejo de reproductores depende del control de todas las medidas apropiadas que permitan a un grupo en cautiverio someterse a la maduración y desove de huevos viables. La herramienta más sencilla ha sido la inducción ambiental, basada en la manipulación de la temperatura y el fotoperiodo para favorecer la maduración de las gónadas. Además de la manipulación de las condiciones ambientales, se utiliza de forma exitosa la inducción con hormonas exógenas. El protocolo de administración y procedimientos de adquisición de gametos pueden variar dependiendo de la biología reproductiva de cada especie, y una minuciosa comprensión del control endocrino de la gametogénesis, la maduración final y el desove, es esencial para la adecuada gestión de las especies (Mylonas *et al.*, 2010).

A grandes rasgos, la gametogénesis se divide en dos fases, la fase temprana (proliferación, crecimiento y diferenciación de los gametos) y la avanzada (maduración y preparación de los ovocitos y espermatozoides para la liberación). La evaluación precisa de la etapa de la maduración reproductiva es un requisito previo para el éxito de la inducción hormonal, ya que si el tratamiento es aplicado a individuos inmaduros o peces maduros en la primera fase del ciclo reproductivo, el tratamiento será ineficiente (Mylonas *et al.*, 2010).

Los primeros trabajos de inducción hormonal en peces, remonta a los años 30's, donde se inyectaban extractos de glándulas pituitarias obtenidas de otros peces en etapas maduras; que si bien, se obtienen resultados aceptables, existe siempre el riesgo latente de transmisión de enfermedades (Matty, 1985).

Otro método utilizado, es el uso de gonadotrofinas (GtH) aisladas y purificadas de otros vertebrados para ser utilizadas en peces, que dada la similitud estructural de las GtH, ofrecen el mismo resultado entre especies, además que al actuar directamente sobre las gónadas, tienen una gran rapidez de acción y su residencia en el sistema circulatorio permite un efecto más prolongado; sin embargo, una exposición continua al tratamiento, genera una respuesta inmunológica por parte del pez, provocando perdida de efectividad (Pelcastre-Campos, 2006).

Recientemente, se ha utilizado la hormona liberadora de gonadotrofina (GtRH), que son copias sintéticas de las naturales, evitando la respuesta inmune del organismo; está, interviene en el sistema endocrino desde un nivel superior, provocando que la respuesta de estimulación sea más balanceada, es resistente a la degradación enzimática por parte de las endopeptidasas de la hipófisis, hígado y riñón, además de que su afinidad a los receptores de la glándula pituitaria se incrementa, aumentando también su poder de acción entre 30 y 50 veces (Zohar y Mylonas, 2001).

Para *L. peru* se han realizado algunos trabajos sobre inducción al desove. Por ejemplo, Pintos-Terán *et al.* (2003) utilizan la gonadotrofina coriónica humana (HCG) para lograr el desove en esta especie, estableciendo el criterio necesario para la inducción hormonal, de presentar tamaño de ovocitos mayores a 400 micras. Por su parte, Dumas *et al.* (2004)

reportan la manipulación foto-térmica y el uso de HCG para lograr la maduración final y ovulación en organismos mantenidos en cautiverio.

A pesar del desarrollo en las técnicas de inducción hormonal y el éxito relativo de los tratamientos, es necesario profundizar el conocimiento de la gametogénesis de esta especie, para alcanzar resultados eficaces.

2.3 Gametogénesis.

2.3.1 Ovogénesis.

La formación de un huevo es un proceso complejo. En la ovulación, el huevo es autosuficiente para proteger y desarrollar el embrión hasta la eclosión; por lo tanto, la composición pre-desove de éste, ya sea ARNm, nutrientes y hormonas deben de incorporarse durante el desarrollo dentro del ovario; por lo que entender el mecanismo que subyace a los procesos de crecimiento y desarrollo de los gametos así cómo estos procesos son coordinados, es esencial para determinar los factores que afectan la calidad de los huevos y la fertilización (Bobe y Labbé, 2009).

Se han descrito tres tipos principales de desarrollo ovárico para los peces: El sincrónico, donde todos los ovocitos se desarrollan y ovulan, al mismo tiempo; el sincrónico por grupos, donde al menos dos poblaciones de ovocitos pueden ser reconocidos en el ovario durante toda la temporada y el asincrónico, donde los ovocitos de todas las etapas de desarrollo están presentes sin una población dominante, liberando todos los huevos en un solo episodio en un tiempo corto de tiempo (Wallace y Selman, 1990).

El huachinango del pacífico es un pez gonocórico, presenta un desarrollo gonádico asincrónico, de manera que se pueden encontrar distintas fases de desarrollo de ovocitos en una misma gónada, lo que resulta un factor clave para los desoves fraccionados; Santamaria-Miranda *et al.* (2003) lograron caracterizar los estadios gonádicos para esta especie, dividiéndolo en 4 etapas: Gónadas inmaduras las que se caracterizan por la presencia de ovocitos pequeños (diámetro 4-9 µm); el lumen entre las lamelas ovígeras generalmente es grande. La pared ovárica es delgada y presenta irrigación escasa. Las

gónadas en desarrollo, se caracteriza por presentar ovocitos de entre 16 y 23 µm, la pared gonádica empieza a engrosarse, el lumen disminuye, comienza la aparición de vesículas de vitelo. Las gónadas desarrolladas por su parte, presentan ovocitos con diámetros de entre 32 y 46 µm, en esta etapa, el grosor de la pared ovárica aumenta considerablemente y se observan atresias recientes y tardías de ovocitos de las primeras fases. Las gónadas maduras se caracterizan por la abundancia de ovocitos bien desarrollados entre 60 y 96 µm, las gónadas presentan atresias recientes de ovocitos de fases anteriores. Finalmente, las gónadas en desove en las que predominan los ovocitos de mayor tamaño (diámetro 122-270 µm), donde la pared ovárica tiene un grosor variable, de regular a gruesa. También hay atresias recientes y tardías. Las gónadas de esta categoría comparten características de las gónadas maduras, pero aparecen por primera vez ovocitos hidratados y folículos postovulatorios recientes en pequeña cantidad.

El proceso hormonal durante estas etapas consiste en la liberación de la hormona liberadora de hormona luteinizante (LHRH) por el hipotálamo. Esto estimula la síntesis y secreción de la hormona luteinizante (LH) y la hormona folículo estimulante (FSH) por parte de la hipófisis. En peces, tanto la LH como la FSH provocan la producción de estradiol-17β en las células foliculares a partir de la testosterona (Patiño y Sullivan, 2002), aunque la LH ha mostrado más relación al estimular la síntesis de estradiol-17β (Swanson *et al.*, 2003). Elestradiol-17β es liberado al sistema circulatorio para llegar al hígado donde estimula la síntesis y secreción de vitelogenina (Idler y Ng, 1983). La vitelogenina viaja por el sistema circulatorio hacia las gónadas para incorporarse al oocito. La incorporación ocurre por procesos de pinocitosis de las células foliculares y las microvellosidades conectadas al corion del oocito (Patiño y Sullivan, 2002).

2.3.2 Espermatogénesis.

La espermatogénesis por su parte se divide en tres fases de desarrollo la primera es la proliferación mitótica de espermatogonias, donde comienza una serie de divisiones celulares para aumentar su número, tales divisiones son reguladas por estrógenos (E2) aunque el proceso no es aun bien conocido (Miura *et al.*, 1999). La segunda fase es la

proliferación meiótica de los espermatocitos, en donde el proceso de división celular en las espermatogonias cambia de mitosis a meiosis. En esta fase, los espermatocitos entran en meiosis 2 para la generación de las espermátidas y pierden entre el 80 y 90% de su volumen celular, la cromatina se condensa, el núcleoplasma se incorpora al citoplasma y el material celular es fagocitado, las mitocondrias se concentran en el cuello de la célula y el flagelo crece sin embargo, contrario a los mamíferos, en los peces teleósteos no hay formación de acrosoma. Estas fases están reguladas principalmente por la FSH, aunque los niveles de LH se incrementan después de la meiosis 2. La FSH es la encargada de estimular la activación de las células de Leydig y de Sertoli (Schulz y Miura, 2002).

No obstante, en la acuicultura, el inicio de la gametogénesis, no siempre es un proceso deseado, ya que el proceso reproductivo en los peces, puede tener grandes consecuencias en el cultivo como cambios en el apetito de los peces, variaciones en la tasa de crecimiento, la eficiencia de conversión del alimento, los rasgos de calidad de carne, comportamientos agonísticos, la salud, y la supervivencia de los organismos; por ello, es imprescindible conocer la biología reproductiva de cada especie a cultivar para lograr controlar el inicio de la pubertad (Taranger *et al.*, 2010).

2.4 Pubertad en teleósteos.

La pubertad en los peces se define como el período de desarrollo durante el cual un individuo se vuelve capaz de reproducirse sexualmente por primera vez, e implica una competencia funcional del eje cerebro-hipófisis-gónada (BPG) (Taranger *et al.*, 2010). Ésta comienza justo después de la diferenciación sexual y se caracteriza por la activación simultánea de las dos funciones principales de la gónada, la producción de células germinales y la síntesis de hormonas reproductivas, en particular, los esteroides sexuales (Okuzawa, 2002).

Si bien, se sabe que el eje cerebro-hipófisis-gónadas se activa al comienzo de la pubertad, los detalles que subyacen a esta "activación" aun no son bien establecidos; hay información acerca de los patrones en la secreción de GnRH, la que es promovida básicamente por tres sistemas neuronales, la zona pre-óptica, la neurotrasmisión y la neuromodulación

(Okuzawa, 2002). Este sistema neuroendocrino asimila la información ambiental periférica, que a continuación, llega a la hipófisis donde es procesada, induciendo a la secreción de hormonas peptídicas como la hormona liberadora de gonadotrofina. Estas hormonas se dirigen a la glándula pituitaria donde inducen y regulan la producción de la gonadotrofina, que posteriormente es liberada al torrente sanguíneo por donde circula hasta llegar a las gónadas, órganos productores de esteroides que son los que directamente controlan el desarrollo gonadal (Fig. 2) (Shepherd y Bromage, 1988; Patiño, 1995).

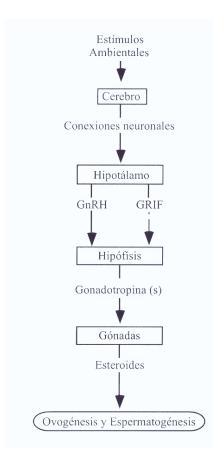


Figura 2. Enlaces neuro-endocrinos del eje hipotálamo-hipófisis-gónada. GnRH hormona liberadora de gonadotropina, GRIF factor inhibidor de la liberación de gonadotropina.

Al igual que en todos los vertebrados, la pubertad en los peces se produce cuando los individuos han alcanzado una cierta combinación entre edad y tamaño, así como la acumulación suficiente de reservas de energía (generalmente en forma de grasa corporal)

para satisfacer las necesidades nutricionales y energéticas propias de la maduración; aunado a eso, la disponibilidad de alimentos y la calidad del agua han demostrado ser factores determinantes en el inicio del ciclo reproductivo (Taranger *et al.*, 2010).

Sin embargo, el inicio de la pubertad y la maduración sexual puede tener un impacto en el sistema inmune de los peces y en consecuencia aumenta la susceptibilidad a la enfermedades (Cuesta *et al.*, 2007). Esto es debido al papel inmunomodulador de las hormonas, tales como el cortisol y la hormona de crecimiento, (Harris y Bird, 2000; Yada y Nakanishi, 2002; McQuillan *et al.*, 2003). El inicio de la maduración sexual también puede conducir a otros cambios fisiológicos, por ejemplo en los salmónidos, la maduración sexual afecta su capacidad osmoregulatoria lo que puede resultar en la deshidratación y la muerte de los organismos (Makino *et al.*, 2007).

2.5 Inmunología reproductiva.

El estudio de las interacciones inmuno-endocrinas en peces (Tabla 1), ha permitido conocer el efecto de algunas hormonas sobre la respuesta inmunitaria, así como las complejas interacciones que tienen lugar entre las diferentes hormonas. Estos estudios resaltan la implicación de estas hormonas en el correcto funcionamiento del sistema inmunitario en peces (Garcia-Ayala *et al.*, 2008).

Tabla I. Efecto (estimulador +, e inhibidor-) de diferentes hormonas sobre la respuesta inmunitaria en peces teleósteos. GH=Hormona del crecimiento, 11-KT= 11-Ketotestosterona, MSH=Hormona estimulante de melanocitos, MCH= Hormona concentradora de melanina.

Hormona	Fagocitosis	Explosión respiratoria	Mitogénesis
Cortisol	-	-	-
GH	+	+	+
Prolactina	+	+	+
11-KT			-
Estradiol			-
MSH	+	+	+
MCH	+	+	+
Endorfina	+	+	
Adenocorticotrop	oina	+	-

La regulación de las células inmunitarias debe de estar controlada, ya que el sistema inmunitario no presenta tolerancia frente a las células germinales. Además, se sabe que los leucocitos producen factores de crecimiento que influyen en la regulación de los procesos de gametogénesis, así como en la ovulación (Hunt y Johnson, 1999). El estudio de estas interacciones en peces, es muy reciente y resulta imprescindible el conocimiento previo de la fisiología de la gónada y de las hormonas que la regulan, ya que los tipos celulares presentes en las gónadas, proliferan, se diferencian y aparecen en proporciones variables a lo largo del ciclo reproductor pudiendo afectar y modificar la respuesta inmunitaria, ya sea de manera positiva o negativa (Lamas-Fernandez, 2008)

Los peces no solo son el grupo de vertebrados menos evolucionado, son también el más diverso ya que se reconocen más de 20,000 especies que ocupan igual número de hábitats muy dispares entre ellos, por lo que el desarrollo de su sistema inmunitario, es muy peculiar. En general, el sistema inmune de los peces, funciona con eficacia, aunque como cualquier otro sistema fisiológico, se puede ver afectado por múltiples factores que dependen del propio hospedador, del agente patógeno o del medio externo. Dicho sistema, funciona de un modo muy similar al resto de los vertebrados y consiste en un mecanismo

de defensa celular y humoral, inducido por un agente extraño (antígeno) que en caso de infectar, la respuesta inmunitaria puede ser innata o adaptativa. La peculiaridad en los peces, radica en que la importancia de su sistema inmunitario innato es muy superior a la del sistema inmunitario adaptativo. Mientras que la respuesta innata es rápida, inespecífica, está muy conservada, es poderosa, versátil e independiente de la temperatura, la respuesta inmunitaria adquirida, es lenta, menos diversa que en el resto de los vertebrados, muy elaborada y sofisticada, posee poca memoria y es dependiente de la temperatura, lo que en organismos poiquilotermos resulta determinante (Esteban y Meseguer, 2008).

El sistema inmunitario por su propia naturaleza es muy sensible a los factores externos e internos de los organismos y es por lo tanto flexible y susceptible de ser modulado, lo que han despertado el interés en la inmunomodulacion como estrategia profiláctica para prevenir enfermedades, esto debido a que los medicamentos como los antibióticos se han utilizado indiscriminadamente en la acuicultura en el pasado, pero el consenso actual es que deben mantenerse a un mínimo su uso debido a la conocida producción de bacterias resistentes, que se consideran una amenaza importante para la salud de los animales (Gudding *et al.* 1999). Por lo que hoy en día, para el control de enfermedades en la acuicultura se buscan vías alternativas; la más recurrida es el manejo nutricional sobre el sistema inmune y el uso de inmunoestimulantes, lo que en la acuicultura ha levantado muchas expectativas (Magnadottir, 2010).

2.6 Manejo Nutricional.

Existen determinadas sustancias (Fig. 3) que habitualmente forman parte de la dieta, como las vitaminas, los aminoácidos, minerales, nucleótidos o ácidos grasos, que tienen un efecto benéfico sobre el sistema inmunitario cuando se suministra a determinadas dosis y aunque estrictamente no son consideradas como inmunoestimulantes, por no actuar directamente sobre los componentes del sistema inmunitario, ayudan a que éste funcione correctamente (Lamas-Fernández, 2008).

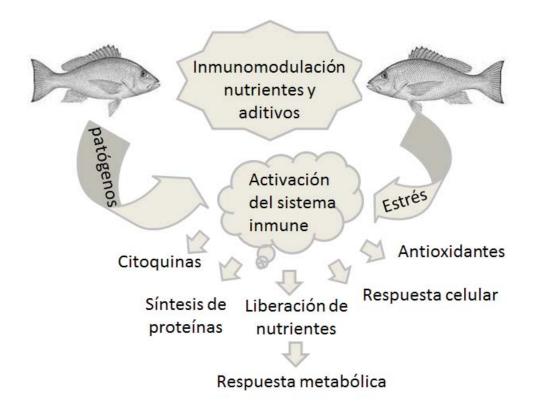


Figura 3. Esquema de inmunonutrición y el cuidado de la salud.

El manejo nutricional de los organismos, puede ser la clave para el desarrollo de una acuicultura sostenible, de éste, depende la posibilidad de controlar en mayor o menor medida cada uno de los factores mencionados con anterioridad; Izquierdo *et al.* (2001) y Sargent *et al.* (2002), coinciden en la importancia de una formulación adecuada de micro y macronutrientes para asegurar un óptimo desarrollo en los reproductores que garantiza niveles apropiados de inmunidad, crecimiento y una adecuada transferencia de nutrientes de la hembra a la progenie.

Actualmente, en las dietas se busca no solo el máximo potencial de crecimiento, sino también a través de éste, incrementar la tolerancia al estrés, fortalecer el sistema inmunológico (Trichet, 2010).

2.7 Ácidos grasos y eicosanoides.

De todos los nutrientes presentes en la dieta de los peces, los lípidos son los más estudiados en términos de nutrición de reproductores. La mayoría de las especies de peces utilizan preferentemente lípidos para proporcionar energía para el crecimiento somático, pero son también una fuente de ácidos grasos esenciales (EFA) requeridos para la formación de las membranas celulares que son vitales para el exitoso desarrollo larval (Sargent *et al.* 2002).

En los peces carnívoros, la utilización de carbohidratos no es muy eficiente, por lo que es indispensable encontrar el nivel óptimo de lípidos ya que existen diferencias entre especies en la capacidad de utilizar altos niveles de lípidos en las dietas; una inadecuada proporción de lípidos puede afectar el rendimiento de crecimiento de los peces o la composición corporal (Sargent *et al.*, 2002).

Sin embargo, hoy se sabe que más que la cantidad de lípidos en la dieta, lo que se debe cuidar es la presencia y proporción de los ácidos grasos esenciales para cada especie (Izquierdo, 2005). Las formas biológicamente activas de ácidos grasos esenciales, son de 20 y 22 carbonos, derivados de los ácidos grasos de 18 carbones poliinsaturados (PUFAs) (18:2n-3 y 18:3n-3) los cuales mediante una serie de elongaciones y desaturaciones, son convertidos a ácidos grasos altamente insaturados (HUFAS) de 20 y 22 carbones (Sargent *et al.*, 2002) (Fig. 4). Sin embargo, los peces marinos, tienen reducida o carente, la enzima delta 5 desaturasa (Mourente y Tocher, 1993), que les impide realizar dicha conversión; por lo tanto, tienen un requisito específico de ácidos grasos HUFAS de 20 y 22 carbonos principalmente de la serie omega 3, los cuales son precursores de eicosanoides (Sargent *et al.*, 2002).

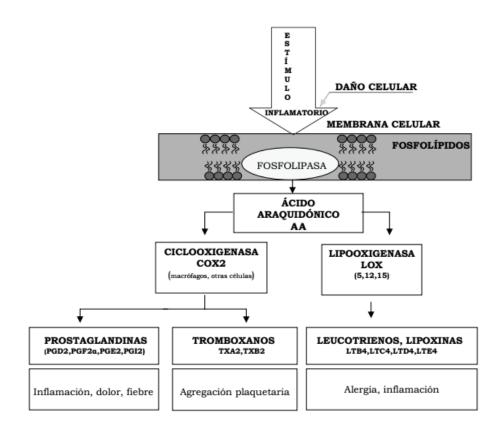


Figura 4. Síntesis y funciones agregantes e inflamatorias de los eicosanoides derivados del ácido araquidónico.

Los eicosanoides, son mediadores inflamatorios y antiinflamatorios; incluyen a las prostaglandinas, los troboxanos, los leucotrenios, los hidroxiácidos y las lipoxinas (Janeway et al., 2005). Las prostaglandinas y troboxanos, son generados por la acción de las enzimas ciclooxigenasas, mientras que los leucotrenios, los hidroxiácidos y las lipoxinas, por las lipooxigenasas (Botana et al., 2002). Los eicosanoides producen una amplia serie de efectos biológicos sobre la respuesta inflamatoria en las articulación, la piel y los ojos, también sobre la intensidad y duración del dolor, así como una participación activa sobre las funciones reproductoras; desempeñan un importante papel en la inhibición de la secreción de los ácidos del estómago, regulan la presión arterial por medio de vasodilatación o vaso constricción e inhiben o activan la agregación plaquetaria y la trombosis (Janeway et al., 2005).

Los peces marinos contienen niveles altos de ácidos grasos insaturados (PUFAs), dentro de los que destacan el ácido eicosapentanoico (EPA) 20:5(w-3) y el ácido docosahexanoico (DHA) 22:6(w-3). Estos ácidos grasos esenciales, juegan un papel importante tanto en la estructura, como en la función de las membranas celulares (Sargent *et al.*, 1997). Además del DHA y EPA, existe otro ácido graso que resulta esencial, el ácido araquidónico, o 20:4(w-6). Este es el principal precursor de las prostaglandinas y los leucotrienos (Castell *et al.*, 1994; Sargent *et al.*, 1997).

En la búsqueda de nuevas y mejores fuentes de lípidos, se han investigado diversas combinaciones de aceites vegetales como el de maíz, colza, linaza, soya, entre otros; sin embargo, no se han obtenido los resultados esperados, por el contrario, se han observado efectos indeseados en la salud de los peces, debido a su limitada capacidad de convertir ácidos grasos de 18 carbones en PUFAs de la serie w-3 (Barandica-Cañon, 2010). Por ellos, continua la búsqueda de sustancias de alto valor biológico tales como ácidos grasos poliinsaturados de la serie w-3, presentes en las microalgas marinas; que además, como fotoautótrofos, sus requisitos de crecimiento son simples, convirtiéndolos en organismos atractivos para los bioprocesos dirigidos a la producción de alimentos dentro de la acuicultura (Guedes *et al.*, 2011).

2.8 Microalgas como fuente de enriquecimiento.

En los últimos años, las microalgas han surgido como una fuente natural interesante de nuevos compuestos con actividad biológica que pueden ser utilizadas como ingredientes funcionales. La mayoría de las microalgas son componentes inmunoestimulantes potenciales o poseen sustancias con capacidades inmunomoduladoras. Además, la composición química de microalgas podría incluir diferentes polisacáridos que pueden ser prebióticos potenciales. Un estudio realizado por Pacheco-Vega *et al.* (2014), aisló y evaluó el potencial como alimento de 5 cepas de microalgas de la Bahía de La Paz Baja California Sur México; encontrando que la cepa *Grammatophora sp.* presentó la mayor proporción de ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs) especialmente ácido eicosapentaenoico (EPA) y Ácido docosahexaenoico (DHA), los cuales no pueden ser sintetizados por los peces, por

lo que deben ser incluidos en la dieta diaria, ya que son sumamente valiosos, pues juegan un papel importante en la composición de la membrana celular, que confieren a los peces, la capacidad de responder de una manera rápida y reversible a cambios de temperatura y presión que asegura las funciones biológicas de las células, además, actúan como precursores de una amplia gama de mediadores del metabolismo que incluyen a los eicosanoides, implicados en los procesos de coagulación de la sangre y el tono cardiovascular, las respuestas inmunes e inflamatorias, la reproducción, las funciones renal y neural (Tocher *et al.*, 2008).

Teniendo en cuenta todo lo anterior, el presente trabajo, pretende evaluar el momento de pubertad de la primer generación de *L. peru* nacidos en cautiverio, así como el potencial efecto modulador de una microalga (*Grammatophora* sp.), sobre la calidad de los desoves mediante la suministración a través de la dieta.

3. JUSTIFICACIÓN.

Se han encaminado distintos estudios para lograr la reproducción exitosa en cautiverio de L. peru, a partir de reproductores colectados del medio natural que han logrado adaptarse y madurar en condiciones de cautiverio, sin embargo, al igual que muchas otras especies con potencial de cultivo, presenta disfunciones reproductivas que impiden que se lleve a cabo con éxito su reproducción. En el Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste (CIBNOR), en La Paz, B.C.S., México, tras seis años de mantenimiento en cautiverio de reproductores silvestres de huachinango del Pacífico, L. peru, se lograron los primeros desoves de manera natural con sincronización de la puesta entre hembras y machos, es decir, sin la aplicación de hormonas y bajo las condiciones ambientales de temperatura y fotoperiodo existentes en el lugar (24°08'N, 110°25'W). A partir de estos desoves, se obtuvo una primera generación de juveniles (F1) en julio 2009. Esta primera generación nacida en cautiverio, abre una ventana única de oportunidades, para lograr el entendimiento de aspectos básicos sobre la biología reproductiva de la especie que permita un mejor entendimiento de los procesos fisiológicos implicados en la reproducción de esta especie. Al tratarse de la primer generación de huachinangos nacidos en cautiverio, podremos determinar con exactitud la edad, peso, talla y niveles hormonales en el momento de primera madurez, que permitirá, elaborar protocolos de maduración en cautiverio específicos para esta especie, para en un futuro, tener la posibilidad de monitorear el estado de madurez de los peces, a través de métodos no invasivos. Así mismo, al tratarse de peces nacidos en cautiverio, son peces, cuyo proceso de aceptación de una dieta formulada resulta exitoso; pudiendo elaborar piensos experimentales y evaluar el uso de sustancias de alto valor biológico, que permitan modular aspectos de crecimiento, nutricionales, reproductivos e inmunológicos; pudiendo generar nueva información en pro de una industria acuícola sostenible.

4. HIPÓTESIS.

Si el momento de primera madurez, está determinado por dos tipos de factores: 1) Intrínsecos como la edad, reloj biológico, estado nutricional, niveles endocrinos, entre otros y 2) Extrínsecos como temperatura, fotoperiodo, alimentación, manipulación, entre otros; entonces, el monitoreo constante de parámetros ambientales, biométricos y niveles hormonales de los juveniles; nos permitirá determinar con exactitud la primera madurez en cautiverio de *L. peru*; así como la temporada, duración y condiciones ambientales en las que se lleva a cabo.

Así mismo la utilización de dietas enriquecidas con una microalga (*Grammatophora sp.*) nos permitirá evaluar el efecto del manejo nutricional, sobre el desempeño reproductivo y la calidad de los desoves del huachinango del Pacifico.

5. OBJETIVOS.

5.1 Objetivo general.

Estimar el inicio de la pubertad en juveniles de *L. peru* mantenidos en cautiverio, y evaluar los efectos del manejo nutricional sobre el desempeño reproductivo y la calidad de los desoves.

5.2 Objetivos particulares.

- A) Evaluar el incremento en talla y peso de juveniles de huachinango del pacifico, nacidos en cautiverio y sus valores máximos a la época de la primera reproducción así como la edad de los reproductores (en días después de la eclosión) alcanzada a la pubertad.
- B) Evaluar la calidad de las puestas y los huevos obtenidos a la pubertad, específicamente: Fecundidad total, tamaño de los huevos, tamaño de la gota lipídica, porcentaje de huevos viables (índice de flotabilidad), porcentaje de eclosión y composición bioquímica de los huevos.
- C) Determinar el momento de primera madurez de juveniles de huachinango mantenidos en cautiverio, mediante cuantificación de los niveles hormonales (Estradiol, testosterona y 11-Ketosterona).
- D) Evaluar el efecto de una dieta enriquecida sobre el desempeño de los reproductores.
- E) Evaluar el efecto de una dieta enriquecida sobre los parámetros zootécnicos (tamaño de huevo, tamaño de la gota lipídica) de los huevos de reproductores de huachinango sometidos a una dieta experimental.

6. MATERIALES Y MÉTODOS.

6.1 Obtención y mantenimiento de organismos.

Se obtuvieron juveniles de huachinango del Pacífico, *L. peru*, en el 2009 a partir de desoves naturales de 20 reproductores silvestres (10 hembras y 10 machos) mantenidos por seis años en cautiverio en un estanque rectangular de 120 m³ con un recambio diario de agua del 10%, bajo condiciones naturales de fotoperiodo y temperatura (24°08'N, 110°25'W).

La alimentación, mantenimiento y cría de larvas se realizaron siguiendo los procedimientos descritos por Leu *et al.* (2003) para *L. argentimaculatus*. Los juveniles obtenidos fueron puestos en 3 tanques de fibra de vidrio de 7 m³ de capacidad (200 juveniles por tanque), con recambio de agua del 200 % diario y con temperatura y fotoperiodo natural. Los peces fueron alimentados diariamente a saciedad, alternando sardina, trozos de calamar y cabezas de camarón, ajustando la ración al crecimiento de los peces.

6.2 Crecimiento y evaluación de la maduración.

Desde octubre del 2009 hasta abril del 2013 se realizaron muestreos periódicos de los tanques para evaluar el crecimiento y la madurez sexual de los juveniles.

Para la evaluación del crecimiento, se tomaron muestras de 60 juveniles, los cuales eran anestesiados con eugenol a una dosis de 0.05 ml/L de agua; se registró la longitud total por medio de un ictiómetro (BMI hergom mod. R18) y el peso por medio de una balanza digital (Torrey PCR20).

A partir del 2012, 22 peces fueron puestos en dos tanques (R1 y R3) de las mismas características que las mencionadas anteriormente (11 peces por tanque), equipados con un colector adyacente de huevos de 100 L de capacidad. Los huachinangos fueron colocados en dichos tanques a una proporción de 3:1 (machos:hembras), a los que se les evaluó el estado de madurez sexual de los organismos por medio de la aplicación de leves masajes abdominales para la detección de machos con esperma fluyente y biopsias ováricas a través

de una cánula de polietileno de 1.3 mm de diámetro interno para la identificación de hembras.

6.3 Fabricación de las dietas.

Se elaboró una dieta semi-humeda experimental y una dieta control con base en la dieta fresca que se ha suministrado a los peces durante toda su vida.

La dieta se formuló con 33 % de harina de pescado "San Carlos" de Guaymas Protein Company S.A. de C.V., 33 % de calamar fresco y 33 % de cabeza de camarón fresca y 1 % de pre mezcla de vitaminas y minerales ROVIMIX® de DSM Nutritional Products. La dieta experimental consistió en la dieta control adicionada con un 3% de ensilado de microalga (*Gramatophora* sp.)

La microalga utilizada fue donada por el Dr. Marco Cadena Roa, de la Universidad Autónoma de Baja California Sur; la cual, se sometió a un proceso de ensilado biológico siguiendo la metodología establecida por Ottati y Bello (1990), en donde el producto en forma de pasta floculada se le adicionó un sustrato (azúcar 15 % peso:peso), ácido sórbico (0.25 %) como fungicida y el inóculo (*Lactobacilus plantarum*) al 1 %. Esta mezcla se homogenizó y dejó fermentar por 72 horas; una vez obtenido el producto se conservó como ensilado húmedo.

La dieta se elaboró en el laboratorio de alimentos de la Universidad Autónoma de Baja California Sur (UABCS), moliendo el calamar y la cabeza de camarón en un molino para carne marca Torrey Mod. MJ-22 y posteriormente se mezcló con la harina de pescado, la pre mezcla de vitaminas y minerales y la microalga ensilada por diez minutos (para el caso de la dieta experimental) en una mezcladora de paletas ASF mod. MZ 100. Se agregó un 8 % de alginato como agente aglutinante y se moldeo en tamaños adecuados para los organismos.

6.4 Diseño experimental del bioensayo.

El bioensayo se realizó en el laboratorio húmedo del Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, donde se distribuyeron 22 peces en dos tanques de 7 m³, con recambio continuo de agua al 200 %, a temperatura ambiente y con fotoperiodo natural; a uno se le suministro la dieta experimental y al otro tanque la dieta control, fueron alimentados *ad libitum* tres veces por semana y se suspendió todo tipo de manipulación de los organismos para evitar trastornos reproductivos causados por estrés.

6.5 Obtención de desoves y evaluación de la calidad de los huevos.

Una vez que se detectaron hembras con ovocitos vitelogénicos (\approx 400 µm), se suspendieron las biometrías para evitar el estrés de los reproductores y facilitar el desove. Cuando se presentaron las puestas, los huevos fueron tomados de los colectores en cada evento de desove y puestos en probetas graduadas de vidrio de 100 mL y valorados mediante el método volumétrico. Se registró el volumen de huevos obtenidos (fecundidad total), el volumen de huevos viables y no viables, considerando a los huevos flotantes como viables y los huevos no flotantes como no-viables, para la determinación del porcentaje de viabilidad.

Para evaluar la fertilización y la eclosión se utilizaron únicamente huevos viables y el procedimiento fue el siguiente: en una microplaca de ELISA de 96 pozos, previamente llenos con agua de mar filtrada a 0.2 μm y a la temperatura y salinidad de los tanques de reproductores, se colocó un huevo por pozo mediante una pipeta de vidrio y la placa se incubó a 25 °C por 24 horas. Las larvas eclosionadas fueron contadas bajo un microscopio estereoscópico con lo que se estimó el porcentaje de eclosión.

Se tomaron muestras tanto de huevos como de larvas para realizar análisis bioquímicos, las cuales fueron liofilizadas, pulverizadas y se tomó un peso aproximado de 0.02 gr de cada una. Una vez pesadas, las muestras fueron re-hidratadas con solución fisiológica (1 mL de NaCl 0.9 % + 0.1 g de muestra) y se les agregó una pizca de arena sílica para posteriormente ser homogeneizadas en un Homogenizador FAST-PREP por 10 segundos.

Para la determinación de proteínas, se utilizó una solución reactiva comercial de Sigma (Solución de ácido bicinconinico B9643 y solución de sulfato de cobre II C2284). Se tomó una alícuota de 20 μL de la muestra por triplicado y se colocó en el fondo de una microplaca (ELISA); se le agregó el reactivo preparado. Se incubó a 60 °C durante 15 minutos y se leyó su absorbancia en un espectofotometro de placas (Termo Multiskan Spectrum) a 563 nm.

Para la determinación de triglicéridos se utilizó una solución reactiva comercial GPO_Trinder (Radox), se tomó una alícuota de 20μL de solución reactiva, se incubó 20 minutos y se leyó a 540 nm.

Los lípidos totales por su parte, se utilizó el método de sulfafosfovainillina según Barnes y Balckstock (1973). Donde una alícuota de 20 μL se coloca en tubos de vidrio, se les agregaron 250 μL de ácido sulfúrico concentrado y se incubó a baño maría a 90 °C por 10 minutos. Posteriormente, se tomaron 20 μL de cada tubo y se colocaron en el fondo de una microplaca; se le agregó la solución preparada para lípidos (sulfafosfovainillina al 0.2% en ácido sulfúrico al 80 %) se dejó incubar por 40 minutos a temperatura ambiente y se tomó la lectura en el espectofotometro de microplacas a 540 nm.

El perfil de ácidos grasos en los huevos obtenidos de ambos tanques, así como del ensilado de microalga, se realizó extrayendo los lípidos totales de acuerdo al método de Folch *et al.* (1957). Los ésteres metílicos de ácidos grasos se prepararon mediante transesterificación catalizada por ácido de los lípidos totales de acuerdo con el método de Christie (2003), estos, se separaron y se cuantificaron por cromatografía de gas-líquido usando una columna capilar flexible de sílice fundida SPTM 2560 (100 m de longitud, diámetro interno de 0,25 mm y grosor de película de 0,20 mm) en un cromatógrafo de gases Hewlett-Packard 5890. Las concentraciones individuales de ácidos grasos se expresaron como porcentajes del contenido total.

Las mediciones de huevos (Fig. 5) se realizaron por medio de fotografías tomadas con una cámara digital (cool SNAP-Pro Colour MediaCybernetics) montada sobre un microscopio

óptico (Olympus BX4). Las imágenes fueron analizadas con el programa Image-ProPlus versión 5.0 para obtener el diámetro total del huevo así como de la gota lipídica (Fig. 5).

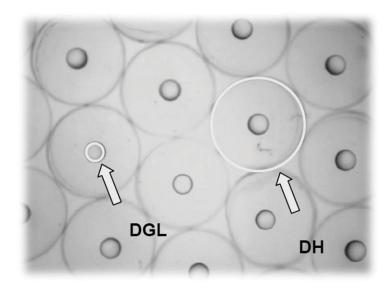


Figura 5. Mediciones biométricas realizadas a huevos de *L. peru*. DGL = Diámetro de la gota lipídica; DH = Diámetro del huevo.

6.6 Niveles hormonales.

La extracción de sangre, se realizó periódicamente a los reproductores en los tres tanques. De cada organismo se extrajeron 2 ml de sangre mediante punción caudal utilizando tubos al vació (BD Vacutainer® con EDTA. Cada una de las muestras de sangre fueron mantenidas en frío y posteriormente centrifugada a 4.000 r.p.m. por 7 min a 4 °C para la obtención del plasma, el cual fue conservado a - 80 °C en un ultracongelador (Fiher Scientific, isotemp freezer) hasta su utilización para la determinación de testosterona (T), estradiol (E2) y 11-ketotestosterona (11-keto), mediante kits comerciales (Cayman Chemical Co.) basados en la técnica de enzimoinmunensayo (ELISA) (estradiol, EIA kit Cat. 582251, Testosterona EIA kit Cat. 582701 y 11-ketotestosterona EIA kit Cat. 582751), en los tres casos, se utilizaron complejos inmunes, resultantes de la conjugación de anticuerpos (IgG monoclonal de conejo) y antígenos, como referencias de cuantificación de cada analito.

6.7 Análisis estadísticos.

A todos los datos obtenidos, se les realizó una prueba de Kolmogorov-Smirnoff para comprobar la normalidad de los datos; seguido de análisis de varianza de una sola vía (ANOVA) para la comparación de medias de las temperaturas registradas durante todo el año, así como para las tallas observadas en cada biometría y los porcentajes de eclosión de todos los desoves, enseguida, se realizaron pruebas de Duncan para determinar las diferencias significativas entre éstas (P<0.05).

Los análisis se realizaron utilizando el software XLSTAT versión 7.5.2 para Windows (1995-2004 Addinsoft ®) y las gráficas se elaboraron con el software Sigma Plot versión 11.0 para Windows (2008 Systat Software Inc. ®).

7. RESULTADOS.

7.1 Primera madurez.

Los organismo nacieron en cautiverio durante el mes de julio del 2009, a los 16 meses de edad se llevó un registro periódico de su crecimiento, comenzando a evaluarlos en noviembre del 2010, se registró una talla promedio de 285.12 ± 2.7 mm y peso de 406.9 ± 9.4 g. Después de 3 años, se observó que más del 50 % de los machos presentaban semen fluyente (PS) durante el mes de junio del 2012, y algunas hembras presentaron ovocitos previtelogénicos, con una talla promedio de 516.04 ± 3.3 mm y peso promedio de $2,274.7 \pm 59.18$ g, la primera madurez sexual (PM) se presentó el mes de junio del 2013, con una talla promedio de 569.0 ± 5.0 mm y un peso promedio de $3,193.4 \pm 128.18$ g. En este estudio se utilizaron 22 ejemplares de *L. peru*, en proporción de sexos 1:3 (hembras:machos); la dominancia de los machos, es un fenómeno regular en lutjanidos (Grimes, 1987) y así lo reporta Rocha-Olivares y Gómez-Muñoz (1993) para la bahía de La Paz (1:0.84 M:H), en ésta misma especie, por lo que mantener esta dominancia, fue

fundamental para la obtención de desoves espontáneos sin necesidad de ningún tipo de inducción química o física (Fig. 6).

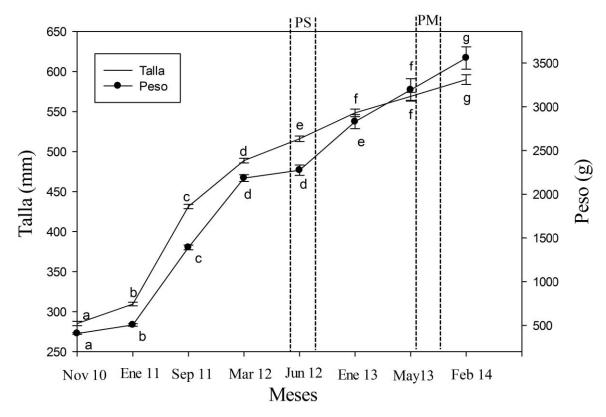


Figura 6. Ganancia en peso y talla de *L. peru* nacidos en cautiverio en el CIBNOR, las distintas letras, indican las diferencias significativas (P <0.05) entre cada muestreo, donde PS= Presencia de semen y PM= Primera madurez, en el eje X se indica el mes y el año en el que se realizó cada biometría.

Se monitorearon diariamente la temperatura de los estanques, mientras que los datos del fotoperiodo, se obtuvieron en la página: http://aa.usno.navy.mil/data/docs/Dur_OneYear.php (Fig. 6); logrando observar que el inicio de los desoves coincide con el mes de mayor incidencia de horas luz (junio-13.36 horas luz) así como en el inicio del aumento de la temperatura en los estanques (24.81±1.4 °C); de manera inversa, el fin de los desoves (25 de noviembre), coincide con el descenso de la temperatura y horas luz (21.2 ± 1.5 °C y 10.5 horas luz).

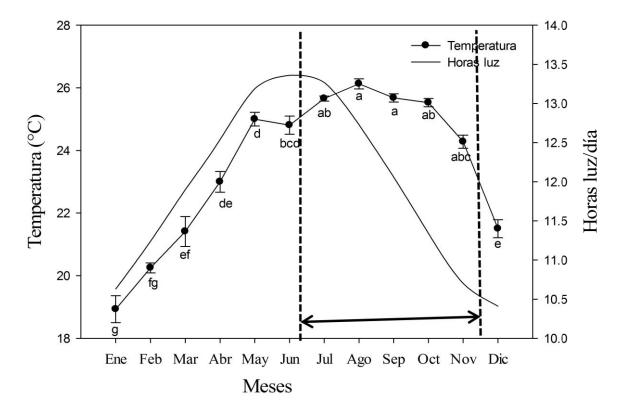


Figura 7. Variación mensual en la temperatura del agua y en el fotoperiodo de los estanques del laboratorio húmedo del CIBNOR, las líneas punteadas, indican el inicio y final de los desoves en 2013. Las distintas letras indican las diferencias significativas (P <0.05) entre las temperaturas registradas.

El primer desove, se obtuvo al cuarto año de vida con un peso promedio de $2,829 \pm 80.9$ g y 452 ± 34 mm de longitud, el día 23 de junio de 2013; durante esa temporada (23 junio al 25 de noviembre del 2013), se observó una mayor cantidad de huevos, durante el mes de julio (585 ml) y la menor cantidad de huevos en el mes de agosto (157 ml) (Fig. 8). Los mayores porcentajes de eclosión, se presentan en los meses de junio y julio (85% y 84% respectivamente), en agosto, el porcentaje de eclosión se reduce significativamente a un 54%.

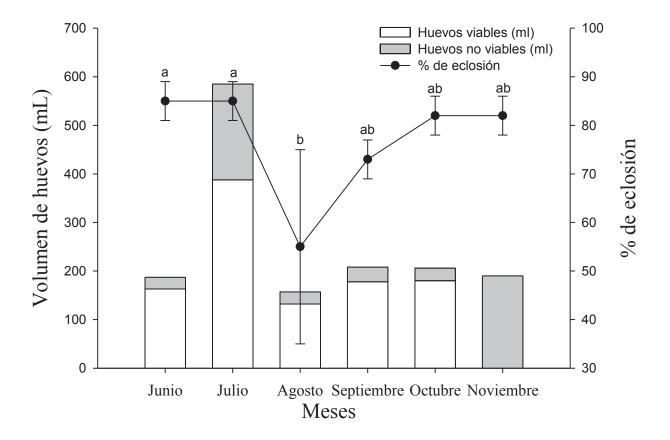


Figura 8. Volumen y porcentaje de eclosión de huevos obtenidos de los desoves naturales de *L. peru* nacidos en cautiverio en 2013, las diferentes letras, indican las diferencias significativas (P <0.05) entre los porcentajes de eclosión de cada mes.

Se obtuvieron un total de 55 desoves desde el 23 de junio al 25 de noviembre del 2013, el tamaño de los huevos es similar durante casi toda la temporada de desove, siendo los huevos del mes de julio los de mayor diámetro (793.9 \pm 1.06 μ m) y en noviembre los más pequeños, (783.3 \pm 1.8 μ m). El tamaño de la gota lipídica mostró su menor diámetro en el mes de junio (131.4 \pm 2.8 μ m) y esta fue incrementando progresivamente hasta alcanzar mayor diámetro durante el mes de septiembre (137.6 \pm 0.6 μ m) y disminuyendo significativamente en el mes de noviembre (129.0 \pm 0.19 μ m) (Fig. 9).

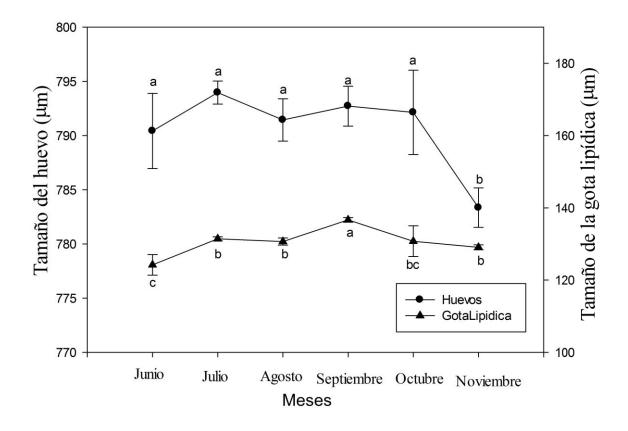


Figura 9. Diámetro de los huevos y de la gota lipídica de los desoves obtenidos en 2013 de L. peru nacidos en cautiverio en las instalaciones del laboratorio húmedo del CIBNOR, las diferentes letras, indican las diferencias significativas (P < 0.05) entre cada mes.

Los valores bioquímicos en los huevos (proteínas, lípidos y triglicéridos), se mantiene constantes casi toda la temporada, observando un ligero aumento en las concentraciones de proteínas ($341.2 \pm 45 \text{ mg/g}$) y lípidos ($133.1 \pm 16 \text{ mg/g}$) durante el mes de septiembre, seguido de una marcada disminución en todos los parámetros durante el mes de octubre; los triglicéridos por su parte, se presentan en la menor concentración de los tres metabolitos, con un máximo en su concentración el mes de noviembre ($123.5 \pm 14 \text{ mg/g}$) y la menor concentración se observa el mes de octubre ($54.8 \pm 13 \text{ mg/g}$) (Fig. 10).

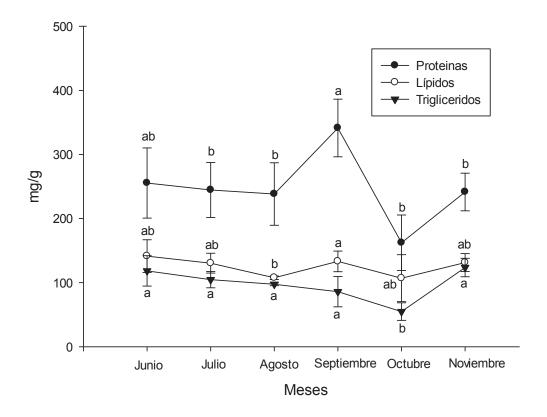


Figura 10. Valores bioquímicos de huevos de juveniles de huachinango L. peru, nacidos en las instalaciones del laboratorio húmedo del CIBNOR en 2009, las diferencias letras, indican las diferencias significativas (P < 0.05) de las concentraciones entre cada mes.

Los niveles hormonales de estradiol (0.9 ± 0.18) , testosterona (13.14 ± 2.06) y 11-ketotestosterona (39.88 ± 3.8) en plasma sanguíneo de los organismos, mostraron valores bajos durante el mes de septiembre del 2011, observándose un incremento progresivo en los años siguientes hasta alcanzar valores máximos en enero de 2013 y manteniendo niveles altos en fechas posteriores (Fig. 11).

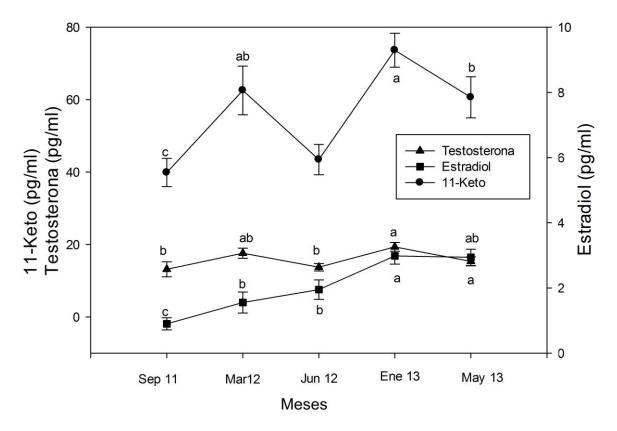


Figura 11. Niveles hormonales en plasma en juveniles de huachinango *L. peru*, nacidos en las instalaciones del laboratorio húmedo del CIBNOR en 2009, las diferencias letras, indican las diferencias significativas (P < 0.05) de las concentraciones entre cada muestreo.

7.2 Manejo nutricional.

No se encontraron diferencias significativas en los parámetros bromatológicos entre la dieta control y la dieta experimental (Tabla II); en ambos casos, existe una clara dominancia de las proteínas. El calamar, es el ingrediente que aporta mayor cantidad de proteínas en la dieta (83.4 ± 0.28) , mientras que la cabeza de camarón es el principal ingrediente que aporta lípidos (14.09 ± 0.27) .

Tabla II. Análisis proximales de los ingredientes, dieta control y dieta experimental, expresados en porcentaje.

Muestra (%)	Microalga ensilada	Cabeza de camarón	Harina de pescado	Calamar	Dieta control	Dieta experimental
Humedad	88.4 ± 0.31	74.5 ± 0.38	5.36 ± 0.20	77.5 ± 0.43	53.6 ± 0.24^{a}	54.2 ± 0.27^a
Proteína	6.09 ± 0.03	49.6 ± 0.19	57.4 ± 0.26	83.4 ± 0.28	60.4 ± 0.27^{a}	59.5 ± 0.25^a
Lípidos	2.07 ± 0.14	14.09 ± 0.27	11.3 ± 0.22	0.52 ± 0.03	12.6 ± 0.16^{a}	12.98 ± 0.20^{a}
Cenizas	47.19 ± 0.27	16.47 ± 0.23	19.0 ± 0.28	6.46 ± 0.12	17.7 ± 0.22^{a}	18.19 ± 0.25^{a}

Las distintas letras, indican las diferencias significativas (P<0.05) entre ambas dietas.

Los desoves obtenidos en ambos tanques, presentan un patrón similar en los volúmenes mensuales, siendo el segundo mes (junio) el que presenta el mayor volumen de huevos obtenidos con 1980 mL para los peces sometidos a la dieta control (R1) y 1685 mL para los peces sometidos a la dieta experimental (R3), mientras que el primer mes (mayo) de la temporada, es el mes en el que se obtiene el menor número de huevos con 320 mL para R1 y 265 mL para R3. Los porcentajes de eclosión entre ambos tanques, presentan diferencias significativas (P<0.05), ya que en el tanque sometido a la dieta control, se observan variaciones mensuales en dichos porcentajes, iniciando el porcentaje más bajo durante el primer mes de la temporada (39±5%), que se incrementa a su nivel más alto durante junio (64.8±7.2%) y finalmente desciende a un 49 y 52% en julio y agosto respectivamente; caso contrario, el tanque sometido a la dieta experimental, mantiene sin diferencias significativas (P<0.05) los porcentajes de eclosión durante toda la temporada, incluso aumenta de un 63±9.4% al inicio de la temporada para cerrar con un 77 ± 8.2 % el último mes de desoves (Fig. 12).

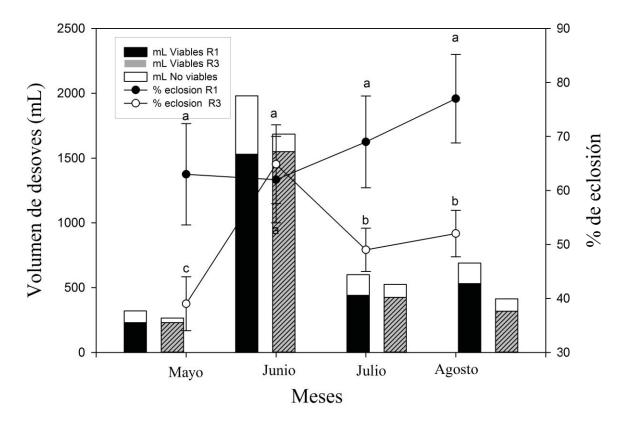


Figura 12. Desoves naturales de huachinangos del pacífico, obtenido en 2014 de dos tanques sometidos a una dieta experimental (R1) y una dieta control (R3), las diferentes letras, indican las diferencias significativas (P<0.05) entre los porcentajes de eclosión.

El tamaño de la gota lipídica, no presentó diferencias entre ambos tratamientos, registrando los menores diámetros durante el primer mes de desoves (mayo) con $124.19 \pm 2.8 \mu m$ para R1 y $118.2 \pm 4.2 \mu m$ para R3; seguido de un incremento paulatino hasta alcanzar el mayor diámetro en ambos tratamientos durante el mes de agosto (136.6 ± 0.6 y $136.5 \pm 1.6 \mu m$ respectivamente) (Fig. 13).

En el tamaño del huevo, se observa una notable diferencia en el tanque sometido a la dieta control, en el que se observó una serie de fluctuaciones en el diámetro del huevo durante la temporada de desoves, oscilando entre el menor diámetro (776.6 \pm 3.8 μ m) en mes de mayo y el mayor durante el mes de agosto (792 \pm 0.8 μ m); mientras que en el tanque sometido a

la dieta experimental, el diámetro del huevo, no presenta diferencias significativas (P<0.05) durante toda la temporada siendo el mes de junio, el mes en que se alcanza el máximo diámetro de huevos ($793.97 \pm 1.06 \mu m$).

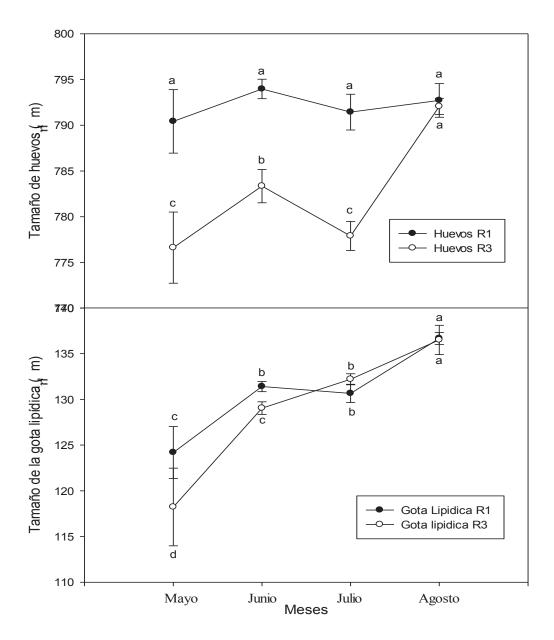


Figura 13. Promedios \pm error estándar del tamaño de huevo y de gota lipídica de huevos obtenidos de peces sometidos a una dieta experimental (R1) y a una dieta control (R3), las diferentes letras, indican las diferencias significativas (P <0.05) entre el tamaño del huevo y de la gota lipídica.

El perfil de ácidos grasos (Tabla III), revela que no existen diferencias significativas en la concentración de ácidos grasos entre los huevos obtenidos en ambos tanques; así mismo, se observa una clara dominancia del ácido docosahexanoico (DHA) en comparación con otros ácidos grasos de importancia como el EPA y el ARA y una clara dominancia de ácidos grasos poliinsaturados (PUFA) de la serie n-3; el ensilado de la microalga por su parte, muestra una clara dominancia de EPA sobre DHA y ausencia de ARA.

Tabla III. Perfil de ácidos grasos de los huevos obtenidos de peces sometidos a una dieta experimental (R1) y una dieta control (R3).

mgAG/g tejido	Dieta experimental	Dieta control	Microalga
Total saturated	14.53±3.09 ^a	14.57±6.65 ^a	34.97
Total monounsaturated	9.36±2.05 ^a	9.32±4.36 ^a	36.67
20:4n-6 (ARA)	0.69 ± 0.15^{a}	0.67 ± 0.32^a	0.00
Total n-6 PUFA	2.00 ± 0.41^{a}	1.96 ± 0.93^{a}	7.93
20:5n-3 (EPA)	3.29 ± 1.64^{a}	3.02 ± 1.87^a	16.61
22:6n-3(DHA)	9.41±2.45 ^a	10.08 ± 4.92^{a}	2.83
Total n-3 PUFA	13.97±4.13 ^a	14.39±7.13 ^a	19.44
Total PUFA	15.96 ± 4.34^{a}	16.35±7.93 ^a	28.36
EPA/DHA	0.35 ± 0.14^{a}	0.29 ± 0.10^{a}	5.86
ARA/EPA	0.25 ± 0.10^{a}	0.27 ± 0.10^{a}	0.00

Las diferentes letras indican las diferencias significativas (P<0.05) entre cada tratamiento.ARA=Ácido araquidónico; PUFA= Ácidos grasos poliinsaturados; EPA= Ácido eicosapentanoico; DHA=Acido docosahexanoico.

8. DISCUSIÓN.

8.1 Primera madurez.

Los peces en cautiverio, a menudo presentan una maduración temprana, dado la disponibilidad constante de alimento, así como la eliminación de presiones por depredación y pesca (Svåsand *et al.*, 1996). Sin embargo, en poblaciones silvestres, sometidas a explotación, de igual forma, se ha observado una notable disminución tanto de la edad como la talla de la primera madurez, como es el caso del bacalao (*Gadus morhua*) (Chen y Mello, 1999), el arenque (*Clupea harengus*) (Engelhard y Heino, 2004) y el salmón (*Oncorhynchus keta*) (Morita *et al.*, 2005; García de Leaniz *et al.*, 2007), como una respuesta fenotípica a las presiones del medio. Por otro lado, algunas especies como la anguila europea (*Anguilla anguilla L.*) no alcanzan la primera madurez sexual en cautiverio, muy probablemente debido a la falta de estímulos y de condiciones apropiadas, para la natación a largo plazo (Dufour *et al.*, 2005; Van Ginneken *et al.*, 2005). Lo que plantea un desafío en acuicultura, debido a que tales respuestas fenotípicas pueden enmascarar la variabilidad en la edad y el tamaño en la maduración, y hacer que sea más dificil seleccionar para fines de madurez.

Todos los trabajos realizados con *L. peru* sobre la edad y el tamaño en el momento de la pubertad se basan en el examen de las poblaciones naturales, (Ruiz-Luna *et al.*, 1985; Cruz-Romero *et al.*, 1991; Santamaría *et al.*, 2003; Rojas *et al.*, 2004; Gallardo-Cabello *et al.*, 2010), utilizando métodos indirectos como la lectura de escamas y otolitos, frecuencia de tallas y la observación de las gónadas mediante métodos histológicos (Ruiz-Luna *et al.*, 1985; Cruz-Romero *et al.*, 1991; Rojas-Herrera, 2001; Santamaría-Miranda *et al.*, 2003; Gallardo-Cabello *et al.*, 2010); por lo que es difícil establecer en qué medida la variación en la edad y el tamaño en la pubertad es de origen genotípico o fenotípico, aunque por otro lado, una serie de estudios experimentales han demostrado una gran variación fenotípica en edad y tamaño al momento de la pubertad en otras especies marinas que se cultivan actualmente (Bromage *et al.*, 2001); por ejemplo la lubina (Rodríguez *et al.*, 2001), el besugo (Matic- Skoko *et al.*, 2007), el rodaballo (Imsland *et al.*, 1997), el atún rojo

(Fromentin y Powers, 2005), el bacalao del Atlántico (Olsen *et al.*, 2005; Karlsen *et al.*, 2006) y el lenguado (Mollet *et al.*, 2007).

Hasta 2009, no se contaba con ningún lote de huachinangos nacidos en cautiverio, por lo que el principal aporte de este estudio radica, en que al ser la primera generación esta especie nacida en cautiverio, se conoce con exactitud la edad de los organismos al alcanzar la edad de primera madurez; sin embargo, las condiciones controladas del cautiverio influyen fuertemente en el desarrollo de los organismos, por lo que las estimaciones no son directamente comparables a los estudios realizados con organismos silvestres, donde se han reportado longitudes totales de primera madurez que van de los 222 mm (Cruz-Romero *et al.*, 1991) a los 295 mm (Santamaría-Miranda *et al.*, 2003) con tres años de edad; mientras que en cautiverio el periodo de pubertad se alcanzó al cuarto año de vida (23 junio de 2013), con un peso promedio de 2 829 \pm 80.9 g y una longitud total promedio de 452 \pm 34 mm; tal retraso se puede atribuir tanto a las condiciones de cautiverio como al efecto de la dieta, que en ambos casos difiere sensiblemente de las que los organismos pueden encontrar en estado silvestre, sin embargo, nuestros resultados, permiten sentar las bases para los protocolos de maduración en cautiverio de esta especie.

Si bien se detectaron los primeros machos fluyentes y hembras previtelogénicas a los 3 años de edad con un peso promedio de $1~467 \pm 0.38~g$ y una talla promedio de $452 \pm 34~mm$; no se obtuvieron desoves durante ese año, ya que se sabe que para que un pez alcance la madurez plena, debe de incluir un aumento de la secreción de esteroides sexuales, la maduración y funcionamiento completo de la gónada (Ojeda *et al.*, 2006); y dado que en este sentido, los peces presentaban signos de madurez, no lograron reproducirse hasta el cuarto año de vida, cuando se llevó a cabo la activación plena del sistema neuroendocrino; los cuales, dependen de otros factores además de la edad, uno de los más ampliamente estudiados, son los estímulos ambientales.

Los parámetros ambientales, tales como fotoperiodo y temperatura, influyen fuertemente en los ciclos de vida de los peces, modulando su fisiología, comportamiento, peso corporal, ingesta de alimento, actividad motora, inmunidad y reproducción (Bowden *et al.*, 2007); sin embargo, Bromage *et al.* (2001) aseguran que en las regiones tropicales y subtropicales, donde las variaciones estacionales de fotoperiodo y temperatura son relativamente

pequeñas, estos dos parámetros pueden ser permisivos en la modulación de los eventos reproductivos; por ello, la temporada de desove de esta especie, ha sido reportada por algunos autores dividida en un amplio margen estacional: mayo-junio y noviembrediciembre (Espino-Barr et al., 2006), marzo-mayo y septiembre-diciembre (Rojas-Herrera, 2001), marzo y agosto-septiembre (Santamaría-Miranda et al., 2003), mientras que autores como Ruiz et al. (1982); Aguilar (1986) y Ochoa et al., (1991), reportan que esta especie, tiene un solo momento reproductivo en el año asociado a un incremento en la temperatura superficial de agua y el inicio de la temporada de lluvias; lo que se asemeja más a lo observado en este estudio, donde solo se presenta una temporada ininterrumpida que se extiende de junio a noviembre, coincidiendo el inicio de los desoves, con el aumento de la temperatura en los tanques y el número de horas luz, y finaliza cuando disminuye tanto la temperatura como el fotoperiodo. Esto sugiere que si bien las variaciones ambientales en las regiones tropicales son mínimas, los huachinangos son capaces de responder de distintas maneras, en función de los parámetros ambientales de cada zona; esto pudiera explicar que se reporten distintos máximos reproductivos a lo largo del año, dependiendo de la región donde se realice cada estudio. Actualmente se ha podido establecer que el inicio de la pubertad se caracteriza por una activación del eje cerebro-hipófisis gónada probablemente mediada por los parámetros ambientales externos a más de los genéticos propia de la especie en cuestión. Sin embargo, los mecanismos endócrinos y moleculares involucrados en el proceso de la pubertad y la influencia de las condiciones ambientales no están bien conocidas en los peces y menos en el huachinango que presenta una reproducción asincrónica con varios máximos a lo largo del año. Recientemente (Espigares et al., 2017) demostraron que diferentes fotoperiodos aplicados a un teleósteo marino, fueron capaces de dirigir los niveles de expresión de algunos péptidos cerebrales (kisspeptinas, GnRHs), gonadotrofinas (Fsh) y esteroides sexuales (11-KT) alterando la época de puestas. El haber podido acotar en este estudio algunos parámetros ambientales como el fotoperiodo y la temperatura al momento del inicio de la pubertad y conocer su biología reproductora, abre muchas posibilidades de efectuar estudios posteriores del control ambiental de la pubertad de esta especie.

Los huevos obtenidos durante la primera madurez, presentaron porcentajes de eclosión bajos en comparación con reportes para esta misma especie de hasta 95% de eclosión (Estrada-Godínez *et al.*, 2015), sin embargo se trataba de organismos silvestres, lo que puede determinar tal diferencia; en otros trabajos, los peces de origen silvestre, fueron sometidos a un periodo de cautiverio y luego estimulados al desove mediante inducción hormonal; con esto, los porcentajes de eclosión disminuyen a un 88% (Pintos-Terán *et al.*, 2003) y hasta un 70% (Moguel-Hernández *et al.*, 2013); algo más cercano a los porcentajes de eclosión observados en este trabajo.

El tamaño de los huevos, por su parte, es otro criterio de calidad ampliamente reconocido, es fácil de cuantificar y refleja la cantidad de recursos que las madres invierten en la descendencia; las imágenes digitalizadas y las mediciones asistidas por computadora arrojan una determinación confiable (Lahnsteiner y Patarnello, 2005). Mansour *et al.* (2008) encontraron una correlación positiva entre el tamaño del huevo y la tasa de fecundidad. En este trabajo, se observó que el tamaño del huevo, se mantiene constante durante casi toda la temporada reproductiva, solo en el último mes de desoves (Fig. 9) el tamaño del huevo disminuye significativamente; lo que coincide con lo observado por Lavens *et al.* (1999) para el rodaballo, quien demuestra que conforme la temporada de reproductiva avanza, el tamaño del huevo disminuye y con ello disminuyen también el porcentaje de fecundación y eclosión en los desoves; lo que demuestra que la calidad de los desoves de huachinango del pacifico, pueden evaluarse en función de las medidas morfométricas del huevo.

La embriogénesis y el desarrollo larvario son procesos largos que requieren un alto aporte de nutrientes y energía de las reservas contenidas en el huevo; estos, regulan la homeostasis y el desarrollo de las larvas durante la fase lecitotrófica; su composición bioquímica es específica de cada especie, varía tanto cualitativa como cuantitativamente. (Dayal *et al.*, 2003; Cejas *et al.*, 2004; Kamler, 2005). Se sabe que el turbot (*S. maximus*) cataboliza proteínas y carbohidratos exclusivamente (Planas *et al.*, 1989), mientras que la de trucha (*Oncorhynchus mykiss*) utiliza proteínas, lípidos y carbohidratos para satisfacer sus necesidades energéticas (Boulekbache, 1981). Durante el presente trabajo se observa una

marcada dominancia de las proteínas sobre los lípidos y triglicéridos; lo que difiere de reportes con otras especies de peces marinos, como turbot (*Scophthalmus maximus*) o la cobia (*Rachycentron canadum*) donde la concentración de lípidos en el huevo, supera por mucho a la de proteínas (Yudong *et al.*, 2014; Faulk y Holt, 2008), los que se puede deber a las diferencias ente las condiciones de temperatura y régimen nutricional; sin embargo, el contenido de lípidos se encuentre dentro de lo observado por otros autores que va del 11 al 35% (Vetter *et al.*, 1983; Ostrowski y Divakaran, 1991; Sargent, 1995; Dayal *et al.*, 2003; Samaee *et al.*, 2009); además que Moguel *et al.* (2013) describen la relación que existe entre algunos metabolitos de origen proteico y el porcentaje de supervivencia para esta misma especie; por lo que la dominancia de proteínas sobre lípidos, no necesariamente es un aporte deficiente en la dieta.

Por su parte las hormonas tienen un papel importante en la regulación del comportamiento reproductivo de los peces; entre estas, los esteroides sexuales son los responsables de la activación de la hipófisis y el cerebro que conduce a la aparición de la pubertad (Schulz y Goos, 1999). Hasta la fecha, se han logrado desoves naturales de algunos Lutjanidos (Martínez-Lagos, 2003; Leu *et al.*, 2003; Papanikos *et al.*, 2008; Phelps *et al.*, 2009), sin que se tenga registro de los niveles hormonales en sangre al momento de los desoves. Para el caso específico del huachinango del pacifico, se han realizado estudios de inducción hormonal, aunque no con los resultados deseados, la manipulación excesiva y lo invasivo de la inducción hormonal, puede provocar la muerte de los organismos (Dumas *et al.*, 2003).

Las variaciones en las concentraciones plasmáticas de hormonas, se han reportado en algunas especies marinas como *Sparus aurata* y *Dicentrarchus labrax*, donde es común encontrar picos en la concentración de esteroides sexuales a mitad del periodo de desoves, para ir descendiendo, conforme avanza la temporada reproductiva (Rodríguez *et al.*, 2001; Navas *et al.*, 2004); además, se sabe que el momento en que un pez alcanza la pubertad, incluye un aumento de la secreción de esteroides sexuales, la maduración y funcionamiento completo de la gónada (Ojeda *et al.*, 2006); lo que podría explicar el aumento observado durante el mes de marzo (Fig. 11), fecha próxima al inicio de la temporada de desoves.

Dentro del grupo de hormonas analizadas, la testosterona, resulta clave, ya que se trata de un precursor de la 11-KT, por lo que el incremento observado en los niveles plasmáticos de testosterona, coincide con las tendencias observadas en otras especies de peces marinos; donde los niveles de esta hormona aumentan durante la espermatogénesis y disminuyen antes o durante el periodo de espermiación para el caso de machos; mientras que en las hembras, la testosterona es convertida a estradiol, que estimula la síntesis hepática de vitelogenina, que es transportada al ovario para ser incorporado a los ovocitos en crecimiento (Nagahama, 1994; Valdebenito, 2008; Schulz *et al.*, 2010). Más recientemente, Molés *et al.* (2011) y Molés *et al.* (2012.) observaron un prominente pico de la FSH junto con la evolución paralela de la 11 KT, el principal esteroide de los peces macho, durante la fase proliferativa de la lubina. Más tarde, Mazon *et al.* (2014), en esta misma especie demostraron experimentalmente que efectivamente la FSH dispara la proliferación espermática hasta su entra en meiosis, demostrando el papel fundamental que tienen estas hormonas en el inicio de la pubertad de los peces.

8.2 Manejo nutricional.

El huachinangos del pacifico, es una especie que acepta fácilmente el alimento natural tal como calamar, camarón y sardina; pero también pueden adaptarse a dietas artificiales, que son menos caras y más convenientes para usarse. Esta aceptación de las dietas artificiales por los organismos es lo que nos ha permitido investigar algunos aspectos nutricionales que pueden influir en la producción en laboratorio.

La dieta adecuada para promover la maduración gonadal, son los alimento congelados de alta calidad, por lo que la mayoría de los esfuerzos, se enfocan en enriquecer las dietas con derivados marinos frescos tales como calamar, camarones, krill y peces aceitosos, obteniendo buenos resultados en el proceso de maduración (Harvey y Carolsfeld, 1993). Sin embargo Liao *et al.* (2001) sugieren que suministrar alimentos no-procesados, no aportan los niveles adecuados de nutrientes, además de incrementar el riesgo de transmisión de enfermedades (bacterias y virus) y parásitos. Aunado a esto, el periodo de desove,

implica un aumento en los requerimientos nutricionales tales como PUFAS n-3 en particular EPA y DHA (Alvaresz-Lajonchere, 2006); en el huachinango, no existen evaluaciones de dietas exclusivas para reproductores; únicamente se ha evaluado el efecto del fotoperiodo y la temperatura sobre la calidad de los desoves (Pelcastre-Campos, 2006); aunque la influencia de los parámetros ambientales sobre la calidad de los desoves, es un factor determinante, no se debe dejar de lado la evaluación del efecto de la dieta sobre los desoves de esta especie.

La microalgas marinas, representan una oportunidad poco explorada de descubrir nuevos compuestos con propiedades inmunoestimulantes, antioxidantes, antiinflamatorias, antimicrobianas, antivirales y metabólicas (Guedes *et al.* 2011). Sin embargo, los trabajos que evalúan el efecto de las dietas sobre el proceso reproductivo de peces marinos, se realizaron probando únicamente distintas concentraciones de proteínas, carbohidratos y lípidos (Cerda *et al.*, 1994; Carrillo *et al.*, 2000; Izquierdo *et al.*, 2001, Gisbert *et al.*, 2008; Sangsawangchote *et al.*, 2010; Rodríguez-Barreto *et al.*, 2014; Izquierdo *et al.*, 2015; Lemahieu *et al.*, 2015) y en todos los casos, se ha demostrado que las dietas son capaces de modular el proceso reproductivo.

Por ello, la importancia de evaluar el efecto que produce el uso de microalgas, sobre el desempeño reproductivo de peces marinos; recientemente se han estimado los beneficios de incluir los piensos con algunas microalgas marinas sobre el sistema inmune en dorada (Reyes-Becerril *et al.*, 2013), encontrando que es posible alcanzar un efecto benéfico sobre parámetros inmunológicos (peroxidasa, fagocitosis y actividad del complemento) de los peces, así como la expresión positiva de algunos genes asociados a procesos inflamatorios, a través de la dieta; los resultados, sin embargo, solo mencionan que dicho efecto puede ser atribuido a una serie, de compuestos biológicamente activos, sin especificar a cuales.

La utilización en este experimento de la microalga como aditivo, realmente, no afecta los parámetros bromatológicos de las dietas, sin embargo, el desempeño reproductivo de los peces, sometidos a la dieta enriquecida, se ve favorecido, lo que se puede atribuir al aporte extra de PUFAS, especialmente, EPA; al igual que en lo observado por Fernández-Palacios

et al. (1995, 1997), quienes evaluaron el efecto de distintos valores de proteínas y lípidos sobre el desempeño reproductivo de dorada (*Sparus aurata*), encontrando que los porcentajes de huevos viables y malformaciones en el huevo, no dependen del porcentaje de inclusión de lípidos o proteínas, si no dé el origen de los lípidos, ya que las dietas, que por su origen lipídico, contienen mayor concentración de PUFAs n-3, difieren significativamente de las dietas con PUFAs n-6 (Sargent et al., 1999).

En términos generales, los ácidos grasos poliinsaturados de más de 20 carbonos, de la serie n-3 particularmente EPA y DHA, son los principales productores de eicosanoides en peces, los cuales son compuestos altamente activos, que se producen en respuesta a situaciones estresantes por casi todos los tejidos del cuerpo (Izquierdo *et al.*, 2001) y se relacionan positivamente con el porcentaje de huevos viables en los desoves, además de estar implicados en funciones cardiovasculares como la coagulación de la sangre y la respuesta inflamatoria de los reproductores; lo que supone que el aporte extra de ácidos grasos de la serie n-3 provenientes de las microalgas, pudieron favorecer la capacidad de enfrentar de mejor manera el estrés y desgaste propio del proceso reproductivo. Sorbera *et al.* (2001) reconocen que a menudo, el estudio de los ácidos grasos, se aborda solamente desde un punto de vista energético, relegando la evidencia del rol que tienen los ácidos grasos poliinsaturados y sus metabolitos, sobre funciones inmunitarias y reproductivas; ellos demostraron la importancia del ácido araquidónico en la maduración de ovocitos de la lubina europea (*Dicentrarchus labrax*) y sugieren que otros PUFAs pueden desempeñar papeles importantes en el proceso reproductivo de peces marinos.

Este trabajo, expone, la posibilidad de modular el proceso reproductivo a través de la dieta; muestra de ello, se observó en la variación de tamaño del huevo entre los tratamientos durante el experimento (Fig. 13); donde el tamaño del huevo de los peces sometidos a la dieta adicionada con la microalga, resulta mayor; además de no presentar variaciones significativas durante toda la temporada de desoves; esto, coincide con lo descrito por Segers *et al.* (2012), quienes realizaron un estudio con *Simochromis pleurospilus*, y lograron encontrar evidencia de la existencia de un vínculo entre el tamaño del huevo y la expresión génica, así como los ajustes adaptativos maternos como es la reducción o

aumento del tamaño del huevo; encontrando evidencias que sugieren una correlación directamente proporcional entre el tamaño del huevo y el potencial de desarrollo de la descendencia.

La importancia de la transferencia materna radica en la posibilidad de controlar a través de los reproductores la calidad de los desoves; y cuando se trata de reproductores, sin duda, los lípidos son el grupos de nutrientes que mayor atención merecen, ya que juegan un papel clave en el desarrollo gonádico; y es que la utilización de un alimento deficiente en ácidos grasos esenciales para reproductores de *Pagrus major*, provoco un reducido porcentaje de eclosión y un incremento en malformaciones del cuerpo (Fernández-Palacios *et al.*, 1995). Por lo que las diferencias observadas en los porcentajes de eclosión entre ambos tratamientos demuestran la posibilidad de modificar el desempeño reproductivo del huachinango del pacifico mediante la utilización de microalgas como aditivo en dietas formuladas.

9. CONCLUSIONES.

- 1) El huachinango del Pacifico en cautiverio, logra reproducirse por primera vez al cuarto año de vida; aunque para el caso de los machos, se pudo detectar, casos de madurez precoz durante el tercer año. Los parámetros morfológicos del peso y talla al cual alcanzan la pubertad es de 516.04 ± 3.3 mm y 2,274.7 ± 59.18 g para machos y 569 ± 5 mm y 3,193.4 ± 128.18g para las hembras. El saber que los machos alcanzan la pubertad un año antes que las hembras tiene especial relevancia, así como el tamaño que alcanzan al inicio de la pubertad.
- 2) El volumen de huevos obtenido durante la pubertad es muy inferior (1,532 mL) al obtenido por las mismas hembras durante la segunda temporada de desoves (6,478 mL). Otros parámetros que se determinaron durante la pubertad del huachinango fueron el tamaño del huevo y de la gota lipídica, el índice de viabilidad (flotabilidad) y las tasas de eclosión que permitirán caracterizar las tácticas reproductoras de esta especie durante la pubertad y que además servirían de referencia para evaluar posibles diferencias que podrían provocar diversos tratamientos experimentales.
- 3) Se determinó una sola temporada reproductiva al año, en verano-otoño que inicia cuando la temperatura del agua alcanza los 24 °C y 13 horas luz; y termina con el descenso de la temperatura y una reducción en las horas luz/día.
- 4) Con los valores hormonales determinados al momento de la pubertad, es posible establecer los valores críticos que debe alcanzar esta especie para poder iniciar y culminar el proceso reproductor. Valores inferiores no iniciarían el proceso reproductivo de la pubertad.
- 5) La adición de la microalga *Grammatophora sp.*, no tuvo efecto sobre la fecundidad, sin embargo si provocó un aumento en el tamaño de los huevos y unas tasas más elevadas de eclosión, mejorando significativamente el rendimiento reproductivo.

10. LITERATURA CITADA.

- Aguilar, S. F. A. 1986. Determinación de la edad y estimación de la tasa de crecimiento del huachinango del Pacífico mexicano *Lutjanus peru* (Nichols y Murphy, 1922) por el método de lectura de escamas. Tesis de Licenciatura de Biología, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México, México, 76p.
- Agulleiro, M. J., V. Anguis, J. P. Cañavate, G. Martínez-Rodríguez, C. C. Mylonas, J. Cerdá, 2006. Induction of spawning of captive-reared Senegal sole (*Solea senegalensis*) using different administration methods for gonadotropinreleasinghormone agonist. Aquaculture, 257:511–524.
- Ali, M., R. Wootton. 1999. Effect of variable food levels on reproductive performance of breeding female three-spined sticklebacks. Journal of Fish Biology, 55(5): 1040-1053.
- Alvarez-Lajonchñere, L. 2006. Nutrición de Reproductores de Peces Marinos, En: Avances de Nutrición Acuícola VIII. VIII Simposium Internacional de Nutrición Acuícola 15-17 Noviembre. Universidad Autónoma de Nuevo León, Monterrey. Nuevo León, México. ISBN 970-333-5.
- Aristizabal, E, J. Suarez, A. Vega, R. Bargas. 2009. Egg and larval quality assessment in the Argentinean red porgy (*Pagrus pagrus*). Aquaculture, 287:329–334.
- Asturiano, J. F., L. A. Sorbera, J. Ramo, D. E. Kime, M. Carrillo, S. Zanuy. 2000. Hormonal regulation of the European seabass reproductive cycle: anindividualized female approach. J. Fish Biol., 56:1155–1172.
- Barandica-Cañon, L. 2010. Efectos de las dietas experimentales en la respuesta inmune de los peces. Tesis de doctorado. Universidad Autónoma de Barcelona. 127pp.
- Barnes, H., J. Blackstock. 1973. Estimation of lipids in marine animals and tissues: detailed investigation of the sulphophosphovanilun method for 'total'lipids. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology, 12(1): 103-118.
- Bobe, J., C. Labbé. 2009. Egg and sperm quality in fish. Gen. Comp. Endocrin., 165(3): 535-548.
- Bonnet, E., A. Fostier, J. Bobe. 2007. Microarray-based analysis of fish egg quality after natural or controlled ovulation. BMC Genomics, 8: 55.
- Botana, L. M., M. F. Landoni, T. Martín-Jiménez. 2002. Farmacología y terapéutica veterinaria. McGraw-Hill Interamericana de España.
- Boulekbache, H. 1981. Energy metabolism in fish development. Am Zool., 21:377–389.

- Bowden, T. J., K. D. Thompson, A. L. Morgan, R. M. Gratacap, S. Nikoskelainen. 2007. Seasonal variation and the immune response: a fish perspective. Fish Shellfish Immun., 22:695-706.
- Bromage, N., M. Porter, C. Randall. 2001. The environmental regulation of maturation in farmed finfish with special reference to the role of photoperiod and melatonin. Aquaculture, 197: 63–98.
- Brooks, S., C. R. Tyler, J. P. Sumpte. 1997. Egg quality in fish: what makes a good egg? Rev. Fish Biol. Fisher., 7: 387–416.
- Caicedo, J. A., E. A. Rubio, L. A. Zapata, A. Giraldo. 2006. Estimación del crecimiento de *Lutjanus peru* (Pisces: Lutjanidae) basado en capturas artesanales experimentales realizadas en el Parque Nacional Natural Gorgonia y su área de influencia, Océano Pacífico colombiano, Invest. Mar. Valparaíso, 34(2): 163-168.
- Carrillo, M., S. Zanuy, F. Oyen, J. Cerdá, J. M^a. Navas, J. Ramos 2000. Some criteria of the quality of the progeny as indicators of physiological broodstock fitness. En: Recent advances in mediterranean aquaculture finfish species diversification. Cahiers Options Méditerranées, 47: 61-73.
- Castell, J. D., J. G. Bell, D. R. Tocher, J. R. Sargent. 1994. Effects of purified diets containing different combinations of arachidonic and docodahexaenoic acid on survival, growth and fatty acid composition of juvenile turbot (*Scophthalmus maximus*). Aquaculture, 128: 315-333.
- Cejas, J. R., E. Almansa, S. Jerez, A. Bolanos, B. Felipe, A. Lorenzo. 2004. Changes in lipid class and fatty acid composition during development in white seabream (*Diplodus sargus*) eggs and larvae. Comp. Biochem. Physiol., 139: 209–216.
- Cerda, J. L., M. Carrillo, S. Zanuy, J. Ramos. 1994. Effect of food ration on estrogen and vitellogenin plasma levels, fecundity and larval survival in captive sea bass, *Dicentrarchus labrax*: preliminary observations *Aquat. Liv. Resourc.*, 7: 255-266.
- Chen, Y., L. G. S. Mello. 1999. Growth and maturation of cod (*Gadus morhua*) of different year classes in the Northwest Atlantic, NAFO subdivision 3Ps. Fisheries Research, 42: 87-101.
- Chevassus-au-Louis, B., J. Lazard. 2009. Current situation and prospects for international fish farming: consumption and production. Cah. Agric., 18: 82–90.
- Christie W. W. 2003. Lipid analysis. 3rd Edition. The Oily Press, Bridgewater, UK. 224p.
- Cruz-Romero, M., J. Espino-Bar, A. Mimbela-López, L. García-Boa, Obregón-Alcaraz, E. Girón-Botello. 1991. Biología reproductiva de tres especies de Lutjánidos en Colima. Rep. Téc. C.R.I.P. Manzanillo, Colima. I.N.P., México. 118p.
- Cuesta, A., L., A. Vargas-Chacoff, F. J. García-López, G. Arjona, J. Martínez-Rodríguez, J. M. Meseguer, M. Mancera, M. A. Esteban. 2007. Effect of sex-steroid hormones,

- testosterone and estradiol, on humoral immune parameters of gilthead seabream. Fish Shellfish Immunol., 23: 693–700.
- Dayal, J.S., S. A. Ali, A. R. Thirunavukkarasu, M. Kailasam, R. Subburaj. 2003. Nutrient and amino acid profiles of egg and larvae of Asian seabass, Lates calcarifer (Bloch). Fish Physiology and Biochemistry, 29(2): 141-147.
- Dufour, S., F. A. Weltzien, M. E. Sébert, N. Le Belle, B. Vidal, P. Vernier, C. Pasqualini. 2005. Dopaminergic inhibition of reproduction in teleost fishes: ecophysiological and evolutionary implications. Ann. NY. Acad. Sci., 1040: 9-22.
- Dumas, S., M. O. Rosales-Velázquez, M. Contreras-Olguín, D. Hernández-Ceballos, N. Silverberg. 2004. Gonadal maturation in captivity and hormone-induced spawning of the Pacific red snapper (*Lutjanus peru*). Aquaculture, 234(1-4): 615-623.
- Emata, A. C. 2003. Reproductive performance in induced and spontaneous spawning of the mangrove red snapper, Lutjanus argentimaculatus: a potential candidate species for sustainable aquaculture. Aquaculture Research, 2003, 34: 849-857
- Engelhard, G. H., M. Heino. 2004. Maturity changes in Norwegian spring-spawning herring before, during, and after a major population collapse. Fisheries Research, 66(2): 299-310.
- Espigares, F., A. Rocha, A. Gómez, M. Carrillo, S. Zanuy. 2017. Photoperiod modulates the reproductive axis of European sea bass through regulation of kiss1 and gnrh2 neuronal expression. General and Comparative Endocrinology, 240: 35-45.
- Espino-Barr, E, D. Hernández-Montaño, E. Cabrera-Mancilla, R. M. Gutiérrez-Zavala, H. A. Gil-López, E. G. Cabral-Solís, A. García-Boa, C. Meléndez, M. Puente-Gómez, C. Romero-Acosta. 2006. Huachinango del Pacífico Sur. In: Arreguín-Sánchez F, L Beléndez-Moreno, I. Meléndez-Gómez, R. Solana-Sansores, C. Rancel-Dávalos (eds.). Sustentabilidad y pesca responsable en México. Evaluación y manejo. INPSAGARPA, México, pp. 101-129.
- Esteban, M. A., J. Meseguer. 2008. Inmunidad celular en peces. En: Inmunología e inmunopatología en piscicultura. Universidad de Murcia. 274p.
- Estrada-Godínez, J. A., L. D. Moreno-Figueroa, M. Maldonado-García, J.C. Pérez-Urbiola, J. Romero-Rodríguez, J. M. Audelo-Naranjo. 2015. Influence of the temperature on the early larval development of the Pacific red snapper, *Lutjanus peru* (Nichols & Murphy, 1922). Lat. Am. J. Aquat. Res., 43(1): 137-145.
- FAO. 2012. El estado Mundial de la pesca y la Acuacultura 2012. Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura. Roma.
- Faulk, C. K., G.J. Holt. 2008. Biochemical composition and quality of captive-spawned cobia *Rachycentron canadum* eggs. Aquaculture, 279:70–76.
- Fernández-Palacios, H., M. S. Izquierdo, L. Robaina, A. Valencia, M. Salhi, D. Montero. 1997. The effect of dietary protein and lipid from squid and fish meals on egg

- quality of broodstock for Gilthead seabream *Sparus aurata*. Aquaculture, 148: 233–246.
- Fernández-Palacios, H., M. S. Izquierdo, L. Robaina, A. Valencia, M. Salhi, J. Vergara. 1995. Effect of n-3 HUFA level in broodstock diets on egg quality of gilthead seabream *Sparus aurata* L. Aquaculture, 132: 325–337.
- Folch, J., M. Lee, G. A. Stanley. 1957. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. J. Biol. Chem., 226: 497-509.
- Fromentin J. M., J. E. Powers. 2005. Atlantic bluefin tuna: population dynamics, ecology, fisheries and management. Fish Fisher., 6: 281–306.
- Gallardo-Cabello, M., M. Sarabia-Méndez, E. Espino-Barr, V. Anislado-Tolentino. 2010. Biological aspects of *Lutjanus peru* in Bufadero Bay, Michoacán, México: growth, reproduction and condition factors. Revista de Biología Marina y Oceanografía, 45: 205-215.
- García de Leaniz, C., I. A. Fleming, S. Einum, E. Verspoor, W. C. Jordan, S. Consuegra, N. Aubin-Horth, D. Lajus, B. H. Letcher, A. F. Youngson, J. H. Webb, L. A. Vollestad, B. Villanueva, A.Ferguson, T. P. Quinn. 2007. A critical review of adaptive genetic variation in Atlantic salmon: implications for conservation. Biological Reviews, 82: 173-211.
- García-Ayala, A., E. Chávez-Pozo, I. Mulero-Méndez, V. Mulero-Méndez. 2008. Interaccion Inmunoendocrina. En: Inmunologia e inmunopatologia en piscicultura.
- García-Hurtado P. A. 2008. Determinación bioquímica en plasma de la condición nutricional en reproductores de *Lutjanus peru* (nichols y murphy, 1922) bajo condiciones de cautiverio. Tesis de Maestria CIBNOR. México. 70p.
- Garduño-Dionate, M., M. L. Unzueta-Bustamante, M. Hernández-Martínez, R. M. Lorán-Núñez, F. R. Martínez-Isunza. 2010. Crecimiento de huachinangos juveniles silvestres (*Lutjanus peru*) en un encierro de engorda en Puerto Vicente Guerrero, Guerrero. Cienc. Pesq., 18(1): 93-96.
- Giménez, G., A. Estevez. A, Lahnsteiner, B. Zecevic, J. G. Bell, R. J. Henderson, J. A. Pinera, J. A. Sanchez-Prado. 2006. Egg quality criteria in common dentex (*Dentex dentex*). Aquaculture, 260: 232–243.
- Gisbert, E., J. B. Ortiz-Delgado y C. Sarasquete. 2008. Nutritional cellular biomarkers in early life stages of fish. Histology and histopathology, 23(12): 1525-1539.
- Grimes, C. 1987. Reproductive biology of the Lutjanidae: a review, pp. 239-294. In J.J. Polovina y S. Ralston (eds.). Tropical Snapper and Grouper: Biology and Fisheries Management. Westview, Boulder, U.S.A. 659 p.
- Gudding, R., A. Lillehaug, A. Evensen. 1999. Recent developments in fish vaccinology. Vet. Immunol. Immunopathol., 72: 203–212

- Guedes, A. C., H. M. Amaro, F. X. Malcata. 2011. Microalgae as sources of high addedvalue compound sea brief review of recent work. Biotechnol Prog., 27: 597-613.
- Guzmán-Villanueva, L. T. 2014. Efecto del -glucano 1,3/1,6 sobre la respuesta inmune, la actividad enzimática digestiva y la expresión de genes de *Lutjanus peru* y *Sparus aurata*. Tesis de Doctorado. CIBNOR. México. 124p.
- Harris, J., D. J. Bird. 2000. Modulation of the fish immune system by hormones. Vet. Immunol. Immunopathol., 77: 163–176.
- Harvey, B., J. Carolsfeld. 1993. Induced breeding in tropical fish culture. Ottawa: International Development Research Centre.
- Hunt, J. S., P. M. Hohnson. 1999. Immunology of Reproduction. Academic Press., 2: 798-806.
- Idler, D. R., T. B. Ng. 1983. Teleost gonadotropins: Isolation, biochemistry and function. Fish Pathol., 9: 101-109.
- Imsland, A. K., A. Folkvord, O. D. B. Jonsdottir, S. O. Stefansson. 1997. Effects of exposure to extended photoperiods during the first winter on long-term growth and age at first maturity in turbot (*Scophthalmus maximus*). Aquaculture, 159: 125–141.
- Izquierdo, M. 2005. Essential fatty acid requirements in Mediterranean fish species. Cahiers Options Mediterrane'ennes, 63: 91–102.
- Izquierdo, M. S., H. Fernandez-Palacios, A. G. T. Tacon. 2001. Effect of broodstock nutrition on reproductive performance of fish. Aquaculture, 197: 25–42.
- Izquierdo, M. S., S. Turkmen, D. Montero, M. J. Zamorano, J. M. Afonso, V. Karalazos, H. Fernández-Palacios. 2015. Nutritional programming through broodstock diets to improve utilization of very low fishmeal and fish oil diets in gilthead sea bream. Aquaculture, 449:18-26.
- Janeway C. A., P. Travers, M. Walport, M. J.Schlomick. 2005. Immunobiology: The Immune System In Health And Disease, 6th edition. New York: Garland Science.
- Kamler, E. 2005. Parent–egg–progeny relationships in teleost fishes: an energetics perspective. Rev Fish. Biol. Fisher., 15: 399–421
- Karlsen, O., B. Norberg, O. S. Kjesbu, G. L, Taranger. 2006. Effects of photoperiod and exercise on growth, liver size, and age at puberty in farmed Atlantic cod (*Gadus morhua L.*). ICES J. Mar. Sci., 63: 355–364.
- Kjorsvik, E., A. Mangor-Jensen, I. Holmefjord. 1990. Egg quality in fishes. Adv. Mar. Biol., 26: 71–113.

- Kohn, Y., J. E. Symonds. 2012. Evaluation of egg quality parameters as predictors of hatching success and early larval survival in hapuku (*Polyprion oxygeneios*). Aquaculture, 342: 42–47.
- Lahnsteiner, F., P. Patarnello. 2004. Egg quality determination in the gilthead seabream, *Sparus aurata*, with biochemical parameters. Aquaculture, 237: 443- 459.
- Lamas-Fernandez, J. 2008. Inmunomodulacion. En: Inmunologia e inmunopatologia en piscicultura. Universidad de Murcia. 274p.
- Lanes, C. F. C., T. T. Bizuayehu, S. Bolla, C. Martins, J. M. D. Fernandes, A. Bianchini, V. Kiron, I. Babiak. 2012. Biochemical composition and performance of Atlantic cod (*Gadus morhua L.*) eggs and larvae obtained from farmed and wild broodstocks. Aquaculture, 324: 267–275.
- Lavens, P., E. Lebegue, H. Jaunet, A. Brunel, P. Dhert, P. Sorgeloos. 1999. Effect of dietary essential fatty acids and vitamins on egg quality in turbot broodstocks. Aquac. Int., 7: 225–240.
- Lemahieu, C., C. Bruneel, E. Ryckebosch, K. Muylaert, J. Buyse, I. Foubert. 2015. Impact of different omega-3 polyunsaturated fatty acid (n-3 PUFA) sources (flaxseed, *Isochrysis galbana*, fish oil and DHA Gold) on n-3 LC-PUFA enrichment (efficiency) in the egg yolk. Journal of Functional Foods, 19: 821-827.
- Leu, M. Y., I. H. Che, L. S. Fang. 2003. Natural spawning and rearing of mangrove red snapper, *Lutjanus argentimaculatus*, larvae in captivity. The Israeli Journal of Aquaculture, 55: 22-30.
- Liao, I. C., H. M. Su, E. Y. Chang. 2001. Techniques in finfish larviculture in Taiwan. Aquaculture, 200(1): 1-31.
- Lubzens, E., G. Young, J. Bobe, J. Cerda. 2010. Oogenesis in teleosts: how fish eggs are formed. Gen. Comp. Endocrinol., 165: 367–389.
- Magnadottir, B. 2010. Immunological Control of Fish Diseases. Springer Science+Business Media, 10: 1007-1018.
- Makino, K., T. A. Onuma, T. Kitahashi, H. Ando, M. Ban, A. Urano. 2007. Expression of hormone genes and osmoregulation in homing chum salmon: a minireview. Gen. Comp. Endocrinol., 152: 304–309.
- Mansour, N, F. Lahnsteiner, M. A. McNiven, G. F. Richardson. 2008. Morphological characterization of Arctic char, Salvelinus alpinus, eggs subjected to rapid post-ovulatory aging at 7 °C. Aquaculture, 279: 204–208.
- Martínez-Lagos, R. A. 2003. Maduración y desove de pargo amarillo *Lutjanus argentiventris* (Peters, 1869) en condiciones controladas de temperatura y fotoperiodo. Tesis de doctorado CIBNOR. 118p.

- Matic-Skoko, S., M. Kraljevic, J. Dulcic, I. Jardas. 2007. Age, growth, maturity, mortality, and yield-per-recruit for annular sea bream (*Diplodus annularis L.*) from the eastern middle Adriatic Sea. J. Appl. Ichthyol., 23: 152–157.
- Matty, A. J. 1985. Fish Endocrinology. Croom. Helm. and Timber Press, London. 230pp.
- Mazón, M. J., A. Gómez, O. Yilmaz, M. Carrillo, S. Zanuy. 2014. Administration of FSH in vivo triggers testicular recrudescence of juvenile European sea bass (*Dicentrarchus labrax*). Biol. Reprod., 90 (1): 1-10.
- McQuillan, H. J., P. M. Lokman, G. Young. 2003. Effects of sex steroids, sex, and sexual maturity on cortisol production: an in vitro comparison of Chinook salmon and rainbow trout interrenals. Gen. Comp. Endocrinol., 133: 154–163.
- Miura, T., C. Miura, T. Ohta, M. Nader, T. Todo, K. Yamauchi. 1999. Estradiol-17beta stimulates the renewal of spermatogonial stem cells in males. Biochem. Biophys. Res. Commun., 264(1): 230-234.
- Moguel-Hernández, I., R. Peña, H. Nolasco-Soria S. Dumas, P. Hinojosa-Baltazar. 2013. Egg quality criteria in Pacific red snapper (*Lutjanus peru*). Aquac. Res., 46:909-917.
- Molés, G., A. Gómez, M. Carrillo, S. Zanuy. 2012. Development of a homologous enzymelinked immunosorbent assay for European sea bass FSH. Reproductive cycle plasma levels in both sexes and in yearling precocious and non-precocious males. Gen. Comp. Endocrinol., 176:70–78.
- Molés, G., A. Rocha, F. Espigares, A. Gómez, M. Carrillo, S. Zanuy. 2011. Fsh plasma levels during testicular recrudescence of precocious and non-precocious male European sea bass using a newly developed species specific enzyme-linked immunosorbent assay (elisa). Indian J. Sci. Technol., 4 (S8): 58–59.
- Mollet, F. M., S. B. M. Kraak, A. D. Rijnsdorp. 2007. Fisheries-induced evolutionary changes in maturation reaction norms in North Sea sole Solea solea. Mar. Ecol. Prog. Ser., 351: 189–199.
- Mommens, M., J. M. O. Fernandes, T. Bizuayehul. S. Bolla, I. Johnston, I. Babiak. 2010. Maternal gene expression in Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus L.*) and its relation to egg quality. B. M. C. Research. Notes., 3:138-146.
- Moreno-Figueroa, L. D. 2011. Efecto de la temperatura en el desarrollo larvario temprano del huachinango del Pacífico *Lutjanus peru* (Nichols and Morphy, 1922) Tesis de Maestría. CIBNOR. México. 119p.
- Morita, K., S. H. Morita, M. Fukuwaka, H. Matsuda. 2005. Rule of age and size at maturity of chum salmon (*Oncorhynchus keta*): implications of recent trends among Oncorhynchus spp. Can. J. Fish. Aquat. Sci., 62: 2752-2759.
- Mylonas, C. C., M. Papadakia, M. Pavlidisb, P. Divanacha. 2004. Evaluation of egg production and quality in the Mediterranean red porgy (*Pagrus pagrus*) during two consecutive spawning seasons. Aquaculture, 232(1): 637-649.

- Mylonas, C. C., A. Fostier, S. Zanuy. 2010. Broodstock management and hormonal manipulations of fish reproduction. Gen. Comp. Endocr., 165: 516–534.
- Nagahama, Y. 1994. Endocrine regulation of gametogenesis in fish. Int J Dev. Biol.,
- 38: 217-217.
- Navas, J. M., E. Mañanós, J.Ramos, S. Zanuy, M. Carrillo. 2004. Niveles plasmáticos de hormona luteinizante en machos de lubina (*Dicentrarchus labrax L.*) alimentados con dietas con distinta composición en ácidos grasos. Cienc. Mar., 30(4): 527-536.
- Ochoa, B. R. S., G. M. García, R. R. Martínez. 1991. La actividad reproductiva de *Lutjanus peru* (Perciformes: Lutjanidae) en las costas de San José del Cabo, BCS. Book of Abstracts, II Congreso Nacional de Ictiología, San Nicolás de las Garzas, Nuevo León, México.
- Ojeda, S. R., A. Lomniczi, C. Mastronardi, S. Heger, C. Roth, A. S. Parent, V. Matagne, A. E. Mungenast. 2006. Minireview: the neuroendocrine regulation of puberty: is the time ripe for a systems biology approach?. Endocrinology, 147:1166–1174.
- Okuzawa, K. 2002. Puberty in teleosts. Fish. Physiol. Bioch., 26: 31–41.
- Olsen, E., G. R. Lilly, M. Heino, M. J.Morgan, J. Brattey, U. Dieckmann. 2005. Assessing changes in age and size at maturation in collapsing populations of Atlantic cod (Gadus morhua). Can. J. Fish. Aquat. Sci., 62: 811–823.
- Ostrowski, A. C., S. Divakaran. 1991. Energy substrates for eggs and prefeeding larvae of the dolphin Coryphaena hippurus. Mar. Biol., 109:149–155.
- Ottati, M., M. Gutierrez, R. Bello. 1990. Estudio sobre la elaboración de ensilado microbiano a partir de pescado proveniente de especies subutilizadas. Archivos latinoamericanos de nutrición, 40(3):408-425.
- Pacheco-Vega, J. M., M. A. Cadena-Roa, F. Ascencio, C. Rangel-Dávalos, M. Rojas-Contreras. 2014. Assessment of endemic microalgae as potential food for Artemia franciscana culture. Latin American Journal of Aquatic Research, 43(1): 23-31.
- Papanikos, N., R. P. Phelps, D. A. Davis, A. Ferry, D. Maus. 2008. Spontaneous spawning of captive red snapper, *Lutjanus campechanus*, and dietary lipid effect on reproductive performance. J. World Aquac. Soc., 39: 324–338.
- Patiño, R. 1995. Manipulations of the Reproductive System of Fishes by Means of Exogenous Chemical. Texas Cooperative Fish and Wildlife Research Unit, Texas. 30p.
- Patiño, R., C. V. Sullivan. 2002. Ovarian follicle growth, maduration, and ovulation in teleost fish. Fish. Physiol. and Biochem., 26: 57-70.
- Pelcastre-Campos, V. T. 2006. Inducción a la ovulación y espermiogénensis en el huachinango del Pacífico *Lutjanus peru* (Nichols y Murphy, 1992) y almacenamiento de su semen. Tesis de Maestría. CICIMAR. México. 94p.

- Pérez-Ponce, H. 2010. Cambios fisiológicos ocasionados por el manejo de reproductores silvestres del huachinango del pacifico *Lutjanus peru* durante la inducción al desove y cautiverio. Tesis de Maestría CICIMAR. 64p.
- Phelps, R. P. 2003. Advances and constraints in the production of red snapper *Lutjanus* campechanus: In: International Sustainable Marine Fish Culture Conference Abstracts, October 9–10, 2003, Fort Pierce, Florida, USA. Harbor Branch Oceanographic Institution, Fort Pierce, Florida, USA. 14p.
- Pintos-Terán, P., M. Rosales-Velásquez, S. Dumas, H. Pliego-Cortéz, J.Alcántar-Vázquez. 2003. Características reproductivas del huachinango del Pacífico (*Lutjanus peru*) en cautiverio. Congreso Iberoamericano Virtual de Acuacultura: 615-623.
- Place, A. R. y M. Harel. 2006. .United States Patent.
- Reyes-Becerril, M., F. Guardiola, M. Rojas, F. Ascencio-Valle, M. A. Esteban. 2013. Dietary administration of microalgae Navicula sp. affects immune status and gene expression of gilthead seabream (Sparus aurata). Fish & Shellfish Immunology, 35(3): 883-889.
- Rocha-Olivares, A., V. M. Gómez-Muñoz. 1993. Validación del uso de otolitos para determinar la edad del huachinango del Pacífico *Lutjanus peru*, (Perciformes: Lutjanidae), en la bahía de La Paz y aguas adyacentes, B.C.S., México. Ciencias Marinas 19(3):321-331.
- Rodriguez, L., I. Begtashi, S. Zanuy, M. Shaw, M. Carrillo. 2001. Changes in plasma levels of reproductive hormones during first sexual maturation in European male sea bass (Dicentrarchus labrax L.) under artificial day lengths. Aquaculture, 202(3):235-248.
- Rodríguez, L., S. Zanuy, M. Carrillo. 2001. Influence of daylength on the age at first maturity and somatic growth in male sea bass (Dicentrarchus labrax, L.). Aquaculture 196: 159–175.
- Rodríguez-Barreto, D., S. Jerez, J. R. Cejas, M. Martin, N. G. Acosta, A. Bolaños, A. Lorenzo. 2014. Ovary and egg fatty acid composition of greater amberjack broodstock (Seriola dumerili) fed different dietary fatty acids profiles. European Journal of Lipid Science and Technology, 116(5): 584-595.
- Rojas-Herrera, A. A. 2001. Aspectos de dinámica de poblaciones del huachinango Lutjanus peru (Nichols y Murphy, 1922) y del flamenco Lutjanus guttatus (Steindachner, 1869) (Pisces: Lutjanidae) del litoral de Guerrero, México. Tesis de Doctorado, Facultad de Medicina, Veterinaria y Zootecnia, Universidad de Colima, México, 194p.
- Ruiz-Luna A., B. E. Girón, V. J. Madrid, B. A. González. 1985. Determinación de edad, crecimiento y algunas constantes biológicas del huachinango del Pacífico, *Lutjanus peru* (Nichols y Murphy, 1922). Mem. VII Congr. Nal. Zool.

- Samaee, S. M., A. Estevez, G. Gimenez, F. Lahnsteiner. 2009. Evaluation of quantitative importance of egg lipids and fatty acids during embryos and larvae development in marine pelagophil teleosts: with an emphasis on *Dentex dentex*. J. Exp. Zool. 311A:735–751.
- Sangsawangchote, S., N. Chaitanawisuti, S. Piyatiratitivorakul. 2010. Reproductive performance, egg and larval quality and egg fatty acid composition of hatchery-reared Spotted Babylon (*Babylonia areolata*) broodstock fed natural and formulated diets under hatchery conditions. International Journal of Fisheries and Aquaculture, 2(1): 044-048.
- Santamaría-Miranda, A., J. F. Elorduy-Garay, M. Villalejo-Fuerte, A. A. Rojas-Herrera. 2003. Desarrollo gonadal y ciclo reproductivo de Lutjanus peru (Pisces: Lutjanidae) en Guerrero, México. Rev. Biol. Trop., *51*(2): 489-502.
- Santamaría-Miranda, A. 1998. Hábitos alimenticios y ciclo reproductivo del huachinango Lutjanus peru, (Nichols & Murphy, 1922) Pisces:Lutjanidae en Guerrero, México. Tesis de Maestría. CICIMAR, México. 102p.
- Santamaría-Miranda, A., J. F. Elorduly-Garay, A. Rojas-Herrera. 2003. Hábitos alimentarios de *Lutjanus peru* (Pisces: Lutjanodae) en las costas de Guerrero, México. Rev. Biol. Trop., 51(2):101-123.
- Sargent, J. R., D. R. Tocher, J. G. Bell. 2002. The lipids Fish nutrition, 3: 181-257.
- Sargent, J., G. Bell, L. McEvoy, D. Tocher, A. Estevez. 1999. Recent developments in the essential fatty acid nutrition of fish. Aquaculture, 177(1): 191-199.
- Sargent, J. R., L. A. McEnvoy, J. G. Bell. 1997. Requirements, presentation and sources of polyunsaturated fatty acids in marine fish larval feeds. Aquaculture, 155: 117-127.
- Saucedo-Lozano, M. 2000. Alimentación natural de juveniles de *Lutjanus peru* (Nichols & Murphy, 1922) y *Lutjanus guttatus* (Steindacher, 1869) (Lutjanidae:Perciformes) en la costa de Jalisco y Colima, México. Tesis de Maestría. ICMyL Unidad Mazatlán. México.
- Schulz, R. W., J. Henk. 1999. Puberty in male fish: concepts and recent developments with special reference to the African catfish (*Clarias gariepinus*). Aquaculture, 177(1): 5-12.
- Schulz, R., T. Miura. 2002. Spermatogenesis and its endocrine regulation. Fish Physiol. and Biochem., 26:43-56.
- Segers, F. H. I. D., G. Berishvili, B. Taborsky. 2012. Egg size-dependent expression of growth hormone receptor accompanies compensatory growth in fish. Proc. R. Soc. B., 279(1728): 592-600.
- Shepherd, C. J., N. R. Bromage. 1988. Intensive fish farming. Blackwell Scientific Publications Ltd. 404 pp.

- Sorbera, L. A., J. F. Asturiano, M. Carrillo, 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.
- Svåsand, T., K. E. Jørstad, H. Otterå, O. S. Kjesbu. 1996. Differences in growth performance between Arcto-Norwegian and Norwegian coastal cod reared under identical conditions. J. Fish Biol., 49:108-119.
- Taranger, G. L., M. Carrillo, R. W. Schulz, P. Fontaine, S. Zanuy, A. Felip, F. Weltzien, S. Dufour, Ø.O. Karlsen, B. Norberg, E. Andersson, T. Hansen. 2010. Control of puberty in farmed fish. Gene. and Comp. Endocr., 165:483–515.
- Tocher, D. R., E. Å. Bendiksen, P. J. Campbell, J. G. Bell. 2008. The role of phospholipids in nutrition and metabolism of teleost fish. Aquaculture, 280(1): 21-34.
- Trichet, V. V. 2010. Nutrition and immunity: an update. Aquaculture Research, 41: 357-372.
- Unuma, T., S. Kondo, H. Tanaka, H. Kagawa, K. Nomura, H. Ohta. 2005. Relationship between egg specific gravity and egg quality in the Japanese eel, Anguilla japonica. Aquaculture, 246:493–500.
- Valdebenito, I. 2008. Terapias hormonales utilizadas en el control artificial de la madurez sexual en peces de cultivo: una revisión. Arch. Med. Vet., 40(2): 115-123.
- Van Ginneken, V., Vianen, G., Muusze, B., Palstra, A., Verschoor, L., Lugten, O., Onderwater, M., Van Schie, S., Niemantsverdriet, P., Van Heeswijk, R., Eding, E., Van Den Thillard. 2005. Gonad development and spawning behavior of artificially-matured European eel (*Anguilla Anguilla*). Anim. Biol. 55:203-218.
- Vetter, R. D., R. E. Hodson, C. R. Arnold. 1983. Energy metabolism in a rapidly developing marine fish egg, the red drum (Sciaenops ocellata). Can J Fish Aquat Sci 40:627–634
- Wallace, R. A., K. Selman. 1990. Ultrastructural aspects of oogenesis and oocyte growth in fish and amphibians. J. Electron. Microsc. Tech., 16, 175–201.
- Yada, T., T. Nakanishi. 2002. Interaction between endocrine and immune systems in fish. In: International Review of Cytology A Survey of Cell Biology, 220. Academic Press Inc., San Diego. 92p.
- Yudong, J. Z. Meng, X. Liu, J. Lei. 2014. Biochemical composition and quality of turbot (Scophthalmus maximus) eggs throughout the reproductive season. Fish Physiol Biochem., 40(4): 1093-1104.
- Zavala-Leal I. 2007. Efecto de la temperatura, intensidad de luz, tipo y densidad de presa en la eficiencia alimenticia durante la ontogenia inicial del huachinango del Pacífico (*Lutjanus peru*). Tesis de Maestría. CICIMAR. México. 97p.

Zohar, Y., C. Mylonas. 2001. Endocrine manipulations of spawning in culture fish: from hormones to genes. Aquaculture, 197: 99-136.