



CENTRO DE INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS
DEL NOROESTE, S.C.

Programa de Estudios de Posgrado

Biología y cultivo de la cabrilla sardinera *Mycteroperca rosacea*: desarrollo larvario, ontogenia digestiva y contribución a la optimización del cultivo larvario.

T E S I S

Que para obtener el grado de

Doctor en Ciencias

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

p r e s e n t a

Roberto Alexander Martínez Lagos

La Paz, B.C.S. diciembre de 2009

ACTA DE LIBERACION DE TESIS

En la Ciudad de La Paz, B. C. S., siendo las 9:00 horas del día 30 del Mes de Noviembre del 2009, se procedió por los abajo firmantes, miembros de la Comisión Revisora de Tesis avalada por la Dirección de Estudios de Posgrado del Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S. C., a liberar la Tesis de Grado titulada:

"Biología y cultivo de la cabrilla sardinera *Mycteroperca rosacea*: desarrollo larvario, ontogenia digestiva y contribución a la optimización del cultivo larvario."

Presentada por el alumno:

Roberto Alexander Martínez Lagos

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

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

LA COMISION REVISORA



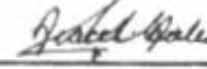
Dr. Vicente Gracia López
DIRECTOR DE TESIS



Darlei Tovar Ramirez
CO-TUTOR



Roberto Civera Carcedo
CO-TUTOR



María Araceli Avilés Quevedo
CO-TUTOR



Juan Pablo Lago Corvera
CO-TUTOR



DRA. ELISA SERVIERE ZARAGOZA,
DIRECTORA DE ESTUDIOS DE POSGRADO

COMITÉ TUTORIAL Y REVISORES DE TESIS

Dr. Vicente Gracia López

Dra. María Araceli Avilés Quevedo

Dr. Juan Pablo Lazo Corvera

Dr. Roberto Civera Cerecedo

Dr. Dariel Tovar Ramírez

JURADO DEL EXAMEN DE GRADO

Dr. Vicente Gracia López

Dra. María Araceli Avilés Quevedo

Dr. Juan Pablo Lazo Corvera

Dr. Roberto Civera Cerecedo

Dr. Dariel Tovar Ramírez

Suplente: Dr. José Manuel Mazón Suástegui

Resumen

La cabrilla sardinera, *Mycteroperca rosacea* es una especie endémica del Pacífico mexicano que tiene importancia en la pesca comercial, deportiva y además cuenta con un alto potencial en la acuicultura. Esta especie ha sido investigada, en los últimos años, obteniéndose avances significativos en el conocimiento de la biología como en la zootecnia de cultivo. Una vez analizados estos logros científicos y tecnológicos, se determinaron los objetivos de esta Tesis: estudiar las características morfológicas de la especie durante su desarrollo larval, determinar el desarrollo estructural del sistema digestivo y determinar la actividad de las enzimas digestivas durante el desarrollo larvario. Determinar el efecto del tipo y densidad del alimento proporcionado a las larvas en su primera alimentación sobre el crecimiento y la supervivencia. De la misma forma, se analizó el efecto de la intensidad de luz en las larvas en su primera alimentación. El estudio del primer objetivo tuvo como resultado la división del periodo larvario, que duró 60 días a una temperatura de $25 \pm 1^\circ\text{C}$, en 8 estadios de desarrollo de acuerdo a las diferentes características morfológicas que presentan las larvas durante su metamorfosis, destacando, la apertura de la boca al tercer día posterior a la eclosión (DPE), la aparición de las espinas extendidas en las aletas pélvicas y dorsal a los 10 DPE, la flexión del notocordio a los 25 DPE, la desaparición de las espinas extendidas de las aletas pélvicas y dorsal entre los 45 y 50 DPE. El crecimiento de las diferentes estructuras corporales analizadas durante el desarrollo larvario fue alométrico con respecto a la longitud total de la larva y mostró dos fases, con un punto de inflexión, que cambio de un crecimiento alométrico negativo en la primera etapa de la metamorfosis, del 1 a los 34 DPE a un crecimiento positivo entre los 35 y 40 DPE, lo que nos indica el desarrollo de una mayor capacidad de las larvas como predadores activos en este segundo periodo y en la primera parte de su desarrollo estos organismos son predadores de oportunidad. Al analizar el tamaño de la boca de las larvas durante su desarrollo larval, se determinó que los rotíferos no son el alimento más apropiado para las larvas de cabrilla sardinera en la primera alimentación. Ya que este tipo de alimento puede ser demasiado grande para las larvas de esta especie. Se determinó que el periodo para comenzar las actividades de manejo y evitar el canibalismo es entre los 40 y 50 días de cultivo dado que en este periodo las larvas reabsorben sus espinas extendidas de las aletas dorsal y pélvicas que los protegen, en parte de predadores potenciales. Al analizar las capacidades digestivas se observó que las larvas poseen parte de su sistema digestivo funcional antes de la apertura de la boca, específicamente el páncreas y el hígado; como es lógico esperar, la capacidad digestiva incrementa conforme la larva crece. Se determinó la actividad de las enzimas: tripsina, quimotripsina, proteasa acida, aminopeptidasa N, fosfatasa alcalina, leucina alanina peptidasa, amilasa, lipasa y maltasa. Podemos sugerir que por el incremento significativo en la actividad de la tripsina, lipasa y amilasa entre los 30 y 40 días posteriores a la eclosión, este es el periodo más apropiado para llevar a cabo el destete en las larvas. Además, se observó una pobre actividad en las proteasas ácidas y se concluyó que esta especie presenta un estómago funcional de forma tardía; estos resultados obtenidos con técnicas bioquímicas, guardan relación directa con los resultados obtenidos del análisis histológico de las larvas. La aparición de las células caliciformes a los 10 días posteriores a la eclosión, nos indica que debemos evitar hasta esta fecha la alimentación

con rotíferos enriquecidos con emulsiones lipídicas comerciales. Se evaluaron diferentes alimentos sobre la supervivencia y el crecimiento de las larvas en periodo de la primera alimentación. Se determinó una supervivencia del 2.2% para las larvas alimentadas con trocóforas de ostión en relación al 0.7% obtenida con los rotíferos y el 0.4 % al proporcionar la mezcla de ambos alimentos. Se evaluó el efecto de la densidad de trocóforas 2, 10, 18, 26 presas/mL, en la supervivencia y el crecimiento de las larvas, durante el periodo de la primera alimentación. En el cultivo donde se proporcionaron 18 presas/mL se obtuvo una supervivencia del 1%, en comparación con el 0.6% obtenido con 10 presas/mL. Con 26 y 2 presas/mL se obtuvo el 0% de supervivencia. Se determinó el crecimiento y la supervivencia en las larvas, expuestas a distintas intensidades de luz, 0, 100, 500 y 1000 lux, obteniendo los mejores resultados a 1000 lux, con un 10.7 % de supervivencia, en comparación con 2.9%, 2.4%, 0.7% de supervivencia obtenidos a 500, 100, 0, lux respectivamente. No se observaron diferencias significativas en el crecimiento de las larvas en ninguno de los tres experimentos realizados.

Palabras clave: *Mycteroperca rosacea*, enzimas digestivas, desarrollo larvario.

Dr. Vicente Gracia López
Director

Abstract

The leopard grouper, *Mycteroperca rosacea*, is an endemic species of the Mexican Pacific coast with commercial and sport fishing relevance and with high potential for aquaculture. This species has been investigated in recent years and has yielded significant advances in our understanding of its biology as well as aquatic husbandry. After analyses of these recent scientific and technological achievements, the objectives of this thesis were identified: (1) to study the morphological characteristics of the species during their larval development, (2) to determine the structural development of the digestive system (3) determine the activity of digestive enzymes and finally (4) to determine the effect of type and density of the food provided to larvae in their first feeding on growth and survival. In addition, we also analyzed the effect of light intensity on first feeding of larvae. Results of the study's first objective indicate that the larval division period, lasted 60 days at a temperature of 25 ± 1 ° C, and included 8 stages of development according to the different morphological characteristics presented by the larvae during metamorphosis. Mouth opening occurred on the third day after hatching (DAH), the appearance of extended spines in dorsal and pelvic fins at 10 DAH, notochord flexion at 25 DAH, the disappearance of the extended spines pelvic and dorsal fins from 45 to 50 DAH. The growth of the various structures analyzed was allometric with respect to the total length of the larva and showed two phases with an inflection point, which presented negative allometric growth in the first stage of metamorphosis from the first DAH to 34 DAH and changed to positive growth between 35 and 40 DAH, which indicates the development of enhanced capacity of the larvae to function as active predators in this second period, while during the first stage of their development these organisms are simply predators of opportunity. By analyzing the size of the mouth of the larvae during their larval development we determined that rotifers are not suitable food for grouper larvae at first feeding. Since this type of food may be too large for the larvae of this species. It was determined that the period for beginning husbandry activities to avoid cannibalism is between 40 and 50 days of culture in this period because at this time the larvae reabsorb their spine of their extended dorsal and pelvic fins that protect them, in part, from potential predators. In analyzing the digestive capacity we observed that larvae have a partial digestive system functioning before the opening of the mouth, specifically the pancreas and liver, as we might expect, the digestive capacity increases as the larvae grow. We determined the activity of enzymes: trypsin, chymotrypsin, acid protease, aminopeptidase N, alkaline phosphatase, leucine-alanine peptidase, amylase, lipase and maltase. In analyzing the results, we can affirm that the significant increase in the activity of trypsin, lipase and amylase between 30 and 40 days after hatching, we conclude that this is the best time to conduct weaning of the larvae. In addition, there was a poor protease activity indicating that this species has a belatedly (late) functional stomach, the previous results were obtained with biochemical techniques were supported by histological analysis of larvae. The appearance of goblet cells within 10 days after hatching indicates that feeding with rotifers enriched with commercial lipid emulsions should be avoided up to this time. We evaluated different foods and their effect on survival and growth of larvae during the first feeding stage. We determined a 2.2% survival for larvae fed with oyster trochophore compared to 0.7% obtained with rotifers and 0.4% to

provide a mixture of both foods. The effect of the density of trochophore of 2, 10, 18, 26 prey/mL on survival and growth of the larvae during the first feeding. In the group where 18 prey/mL were provided a survival rate of 1% was observed, compared with 0.6% obtained with 10 prey/mL. With 26 and 2 prey/mL 0% survival rate was obtained. We determined the growth and survival in larvae exposed to different light intensities, 0, 100, 500 and 1000 lux, the best results were found at a 1000 lux, with a 10.7% survival, compared with 2.9%, 2.4% , 0.7% survival obtained at 500, 100, 0 lux respectively. There were no significant differences in growth of larvae in any of the three experiments.

Keywords: *Mycteroperca rosacea*, digestive enzymes, larval development.

Dr. Vicente Gracia López
Director

Dedicatoria

A: Jesucristo, mi señor y salvador.

A: La virgen María Santísima, madre de Cristo y madre nuestra.

Agradecimientos

A **Dios** primero porque si su ayuda nada es posible.

A la **Secretaria de Relaciones Exteriores de México** por beca proporcionada.

Al **Dr. Vicente Gracia López** por aceptarme como alumno.

A mi comité tutorial:

Dr. Juan Pablo Lazo

Dr. Dariel Tovar

Dr. Roberto Civera

Dra. Araceli Avilés

Al **CONACYT** y el departamento de becas de posgrado del **CIBNOR** por el apoyo proporcionado en mi último año de estudios.

A todas las personas buenas y amables que me ayudaron en las oficinas administrativas y los laboratorios donde se realizaron los trabajos necesarios para el desarrollo de esta tesis.

A la **Dra. Elisa Serviere**, la **Dra. Thelma Castellanos**, la **Lic. Osbelia Ibarra**, la **Lic. Leticia Gonzales**, a **Beatriz Gálvez**, **Claudia Olachea** y **María Guadalupe Sánchez** del programa de posgrado.

A la **M.C. Carmen Rodríguez Jaramillo** y la Técnico de apoyo **María Eulalia Meza**. Por su apoyo en el desarrollo de los trabajos de histología, histoquímica y análisis de imágenes.

A la **Lic. Patricia Hinojosa** por su apoyo en el laboratorio de fisiología comparada.

A los técnicos **Jorge Sandoval** y **Francisco Encarnación** por su apoyo en el patio de cultivos.

A los técnicos **Jorge Angulo** y **Enrique Calvillo** por su apoyo en las salidas de campo.

A los técnicos **Mario Osuna** y **Pablo Ormart** por su apoyo en el laboratorio de larvicultura de organismos marinos.

Al personal del laboratorio de computo **Lic. Horacio Sandoval** y el **Lic. Manuel Melero**.

A todos **mis compañeros y amigos** con los que compartí gratos momentos, que recordare siempre

Dios les bendiga a todos.

Tabla de contenido

1	Introducción	1
1.1	Larvicultura de peces marinos	1
1.2	Biología de la cabrilla sardinera	2
1.2.1	Clasificación taxonómica de la especie	3
1.2.2	Diagnos de la especie	3
1.2.3	Hábitat y distribución geográfica de la especie	4
1.2.4	Antecedentes de investigación de la cabrilla sardinera	5
1.3	Situación actual de la acuicultura mundial	7
1.3.1	Cultivo de los meros en el mundo	8
1.4	Ontogenia en peces	9
1.4.1	Características de los huevos en los peces marinos	11
1.4.2	Periodo embrionario	12
1.4.3	Periodo larvario	14
1.4.4	Modelo de crecimiento larval	20
1.5	Ontogenia digestiva	21
1.5.1	Bioquímica de la nutrición	22
1.5.2	Las proteasas	23
1.5.3	Las amilasas	26
1.5.4	Las lipasas	26
1.5.5	Las fosfatasas ácidas y alcalinas	27
1.5.6	Estudios de caracterización enzimática	27
1.5.7	Efecto del pH sobre la actividad y estabilidad de la enzima	28
1.5.8	Efecto de la temperatura sobre la actividad y estabilidad de la enzima	28
1.5.9	Afinidad por sustratos específicos	29
1.5.10	Descripción del sistema digestivo en los peces	29
1.6	Importancia de los factores ambientales en el cultivo larvario de peces marinos	32
1.6.1	Intensidad de luz	33
1.6.2	Alimento vivo en la larvicultura de peces marinos	35
1.6.3	La captura del alimento	38
2	Justificación	43
3	Hipótesis de trabajo	44
4	Objetivos	45
4.1	Objetivo general	45
4.2	Objetivos específicos	45
5	Materiales y métodos	46
5.1	Desarrollo morfológico y modelo de crecimiento	46
5.1.1	Obtención de huevos, producción de larvas, muestreos y registro fotográfico	46
5.1.2	Evaluación morfométrica	47
5.1.3	Análisis estadístico	48
5.2	Ontogenia digestiva	48
5.2.1	Producción de larvas y análisis enzimático	48
5.2.2	Análisis bioquímico	51
5.2.3	Análisis estadístico	53

5.3	Análisis del tipo y densidad de presas é intensidad de luz óptimos durante la primera alimentación.....	53
5.3.1	Análisis estadístico	54
5.3.2	Evaluación del tipo de presa	54
5.3.3	Evaluación de la densidad de presas.....	55
5.3.4	Evaluación del efecto de la intensidad de la luz en la primera alimentación	56
6	Resultados	57
6.1	Desarrollo morfológico y modelo de crecimiento	57
6.1.1	Desarrollo morfológico.....	57
6.1.2	Crecimiento.....	59
6.1.3	Crecimiento alométrico.....	60
6.2	Ontogenia digestiva	65
6.2.1	Actividad de las proteasas en las larvas alimentadas.....	65
6.2.2	Actividad de la amilasa, maltasa y lipasa en larvas alimentadas.....	67
6.2.3	Actividad de las proteasas en larvas en ayuno.....	69
6.2.4	Actividad de la amilasa, maltasa y lipasa en larvas en ayuno	71
6.2.5	Comparación de la actividad digestiva entre las larvas alimentadas y las larvas mantenidas en ayuno.....	71
6.3	Descripción histológica.....	71
6.3.1	Crecimiento y desarrollo del sistema digestivo	71
6.3.2	Región Bucofaríngea	72
6.3.3	Esófago	72
6.3.4	Estómago	74
6.3.5	Intestino	74
6.3.6	Glándulas accesorias.....	77
6.4	Evaluación del crecimiento y la supervivencia de las larvas alimentadas con diferentes tipos de presa en la primera alimentación.....	78
6.4.1	Crecimiento.....	78
6.4.2	Supervivencia.....	78
6.5	Evaluación del crecimiento y supervivencia de las larvas alimentadas con diferentes densidades de presas en la primera alimentación	79
6.5.1	Crecimiento.....	79
6.5.2	Supervivencia.....	80
6.6	Evaluación del efecto de la intensidad de la luz en el crecimiento y supervivencia de las larvas durante la primera alimentación	82
6.6.1	Crecimiento.....	82
6.6.2	Supervivencia.....	83
7	Discusión	85
7.1	Desarrollo morfológico y modelo de crecimiento	85
7.2	Evaluación bioquímica de la capacidad digestiva	91
7.3	Histología del sistema digestivo en las larvas de cabrilla sardinera.....	99
7.4	Análisis del tipo y densidad de presas e intensidad de luz óptimos durante la primera alimentación.....	103
8	Conclusiones	108
9	Recomendaciones	110

Bibliografía	112
Publicaciones	133

Lista de figuras

		página
Figura 1.	<i>Mycteroperca rosacea</i> .	3
Figura 2.	Distribución geográfica de la cabrilla sardinera.	5
Figura 3.	Nomenclatura usada en los estadios tempranos de peces marinos	10
Figura 4.	Periodo embrionario en <i>Epinephelus merra</i>	14
Figura 5.	Distintas fases del periodo larvario de <i>Paralichthys californicus</i>	15
Figura 6.	Corte transversal del tracto gastrointestinal	31
Figura 7.	Principales tipos de alimento vivo utilizado en larvicultura de peces marinos	39
Figura 8.	Medidas de los caracteres morfométricos en la cabrilla sardinera.	49
Figura 9.	Peso húmedo, longitud total de las larvas de cabrilla sardinera	50
Figura 10.	Desarrollo morfológico de la cabrilla sardinera.	61
Figura 11.	Días de cultivo en relación con la longitud total de la cabrilla sardinera hasta su metamorfosis.	62
Figura 12.	Tamaño de la boca en relación con la longitud total de la cabrilla sardinera, durante su desarrollo larvario hasta la metamorfosis.	62
Figura 13.	Porcentaje de la longitud de la segunda espina dorsal y las espinas pélvicas en relación con la longitud total, en la cabrilla sardinera durante su desarrollo larvario.	63
Figura 14.	Crecimiento alométrico las diferentes estructuras del cuerpo seleccionadas en la cabrilla sardinera.	64

Figura 15.	Actividad de las enzimas digestivas: tripsina, quimotripsina y proteasa acida; en la cabrilla sardinera durante su desarrollo larvario.	66
Figura 16.	Actividad de las enzimas digestivas: aminopeptidasa N, fosfatasa alcalina y leucina alanina peptidasa; en la cabrilla sardinera durante su desarrollo larvario.	68
Figura 17.	Actividad de las enzimas digestivas: amilasa, lipasa y maltasa; en la cabrilla sardinera durante su desarrollo larvario.	70
Figura 18.	Desarrollo del sistema digestivo de la cabrilla sardinera: características generales y región buco faríngea.	73
Figura 19.	Desarrollo del sistema digestivo de la cabrilla sardinera: esófago y estomago.	75
Figura 20.	Desarrollo del sistema digestivo de la cabrilla sardinera: Intestino.	76
Figura 21.	Desarrollo del sistema digestivo de la cabrilla sardinera: hígado y páncreas.	77
Figura 22.	Crecimiento de las larvas de cabrilla sardinera alimentadas con diversos tipos de presas en los primeros 8 días de vida.	78
Figura 23.	Supervivencia de las larvas de cabrilla sardinera en los primeros días de vida alimentadas con distintos tipos de presas.	79
Figura 24.	Crecimiento de las larvas de cabrilla sardinera alimentadas con distintas densidades de presas en los primeros días de vida.	80
Figura 25.	Sobrevivencia de las larvas de cabrilla sardinera alimentadas con distintas densidades de presas en los primeros días de vida.	81
Figura 26.	Supervivencia de las larvas de cabrilla sardinera alimentadas con distintas densidades de presas en relación con el contenido de nitritos y amonio en el agua de cultivo en los primeros días de vida.	82

- Figura 27. Crecimiento de las larvas de cabrilla sardinera en los primeros días de vida sometidos a distintas intensidades de luz. 83
- Figura 28. Supervivencia de las larvas de cabrilla sardinera en los primeros días de vida sometidas a distintas intensidades de luz. 84

Lista de tablas

	página
Tabla I Clasificación de las proteasas por familias.	24
Tabla II Porcentaje de la longitud máxima de la segunda espina dorsal y las espinas pélvicas en relación con la longitud total de las larvas.	63

1 Introducción

1.1 Larvicultura de peces marinos

El cultivo de peces marinos ha atraído la atención en las últimas dos décadas, experimentando un gran auge en años recientes. Esto se debe principalmente al desarrollo y optimización de la tecnología del cultivo en jaulas, así como al mejoramiento de las técnicas de producción de juveniles. Gracias a estos avances, se ha incrementado el número de especies sobre las cuales se desea desarrollar tecnología de cultivo que permita llevar estas nuevas especies a una escala industrial. Uno de los principales problemas que se afrontan en la piscicultura marina, es la obtención de juveniles de forma constante y en las cantidades adecuadas, para solventar, por una parte, la gran demanda que se presentará por los consumidores y por otro lado, para poder comercializar grandes cantidades de producto para que este negocio sea rentable y atractivo para los inversionistas. Tomando en cuenta lo anteriormente expuesto, es necesario tener una supervivencia adecuada en los cultivos larvarios de las especies en las cuales centramos nuestros esfuerzos de producción. Los resultados pueden variar dependiendo la escala en la que se trabaje, ya que a nivel experimental es más fácil alcanzar altas supervivencias, que a escala piloto o comercial; existen reportes de muy altas supervivencias superior al 40% en *M. cephalus* y *E. brasiliensis* (Bass *et al.* 1992; Álvarez-Lajonchere *et al.* 1994). Pero generalmente las supervivencias son más bajas en la mayoría de las especies cultivadas. Dependiendo de la especie, la supervivencia promedio en los centros de producción de juveniles de peces marinos en Japón varía 10 y el 20% (Fokusho 1993).

Los peces marinos que se reproducen mediante huevos de tipo pelágico tienen una baja tasa de supervivencia durante su estadio larvario de manera natural y se compensa en

parte por su alta fecundidad. En los cultivos larvarios desarrollados en cautiverio, los periodos donde ocurren las mayores mortalidades se denominan periodos críticos (Kinne 1977), siendo los principales: la eclosión, la reabsorción del vitelo, la apertura de la boca, el comienzo de la alimentación exógena, los cambios de presa en el alimento vivo, el cambio de dieta de alimento vivo a alimento inerte (destete) y el canibalismo. La optimización de las técnicas de cultivo larvario en peces marinos requiere un conocimiento profundo sobre la biología y fisiología de las especies de interés; de esta forma es posible adecuar las prácticas de manejo, para incrementar la supervivencia en los cultivos disminuyendo la mortalidad en los distintos periodos críticos antes mencionados.

1.2 Biología de la cabrilla sardinera

La cabrilla sardinera (*Mycteroperca rosacea*) forma parte de la familia *Serranidae* y pertenece a la subfamilia *Ephinephelinae* comúnmente llamados meros. Esta sub-familia está compuesta por 15 géneros y 159 especies (Heemstra y Randall 1993). Son peces predadores que se distribuyen en las zonas tropicales y subtropicales de todo el planeta, que se alimentan principalmente de peces, crustáceos y cefalópodos (Parrish 1987; Heemstra y Randall 1993). Y su longitud varía de los 12 centímetros a los 4 metros (Tucker 1999)

Los huevos de estos peces son de tipo pelágico, y sus larvas de tipo planctónico, cuando son juveniles buscan aguas más someras para buscar refugio y alimento (Tucker 1999). Son peces solitarios a excepción de las agregaciones en la época reproductiva, por lo general son residentes de un lugar en particular, arrecife, cueva, etc. (Heemstra y Randall 1993). Los miembros de la subfamilia *Ephinephelinae* son de dos tipos los primeros son cuerpo robusto, de hábitos ligados al bentos y los que poseen cuerpos más fusiformes con hábitos pelágicos. Poseen dientes pequeños y finos en la mandíbula, vómer y palatino.

Algunas especies poseen dientes caninos en la parte frontal de la boca sin presencia de molares y el maxilar inferior se encuentra expuesto al tener el pez la boca cerrada.

1.2.1 Clasificación taxonómica de la especie

De acuerdo con Allen y Robertson 1998. La cabrilla sardinera pertenece a:

Orden: *Perciformes*

Clase: *Actinopterygii*

Familia: *Serranidae*

Subfamilia: *Ephinephelinae*

Genero: *Mycteroperca*

Especie: *Mycteroperca rosacea* (Fig. 1)



Fig. 1 *Mycteroperca rosacea*

1.2.2 Diagnósis de la especie

Los individuos de esta especie generalmente poseen una aleta dorsal única que presenta de VII a IX espinas y de 10 a 21 radios. La aleta anal con III espinas y de 7 a 13

radios. La aleta caudal puede ser truncada o cóncava con 13 a 15 radios ramificados. Las aletas pélvicas con I espina y 5 radios ramificados se encuentran insertas por debajo o hacia atrás de la base de la aleta pectoral. El borde del pre-opérculo es aserrado. El opérculo posee 3 espinas planas. El borde superior del opérculo se encuentra libre y las membranas branquiales separadas. Poseen una sola línea lateral con escamas separadas y pequeñas (Heemstra y Randall 1993; Allen y Robertson 1998); posee el quinto ó sexto radio alargado en la aleta anal. La membrana inter-espinal no es dentada. Los organismos de esta especie poseen de 37-43 branquioespinas y el arco branquial superior más de 21 (Peláez-Mendoza 1997). La línea lateral tiene de 72-77 escamas estenoideas (Op. Cit.)

1.2.3 Hábitat y distribución geográfica de la especie

La cabrilla sardinera (*Mycteroperca rosacea*) es una de las 5 especies de este género presente en aguas tropicales del Pacífico (Roseblatt y Zahuranec 1967; Heemstra y Randall 1993). Se distribuye en la costa sur oriental de Baja California (Pacífico central del este) y en todo el golfo de California hasta Jalisco (Fig. 2) México. Su hábitat incluye áreas rocosas cerca de la línea de la costa, alrededor de las islas y en praderas submarinas (Allen y Robertson 1998; Mendoza-Bustamante 2002).

Se localiza en aguas costeras a profundidades menores de 50 metros, donde la temperatura anual del agua puede fluctuar entre los 20 y 30 grados centígrados, y la salinidad entre las 34 y 35 UPS respectivamente (Kiewek-Martínez 2004).

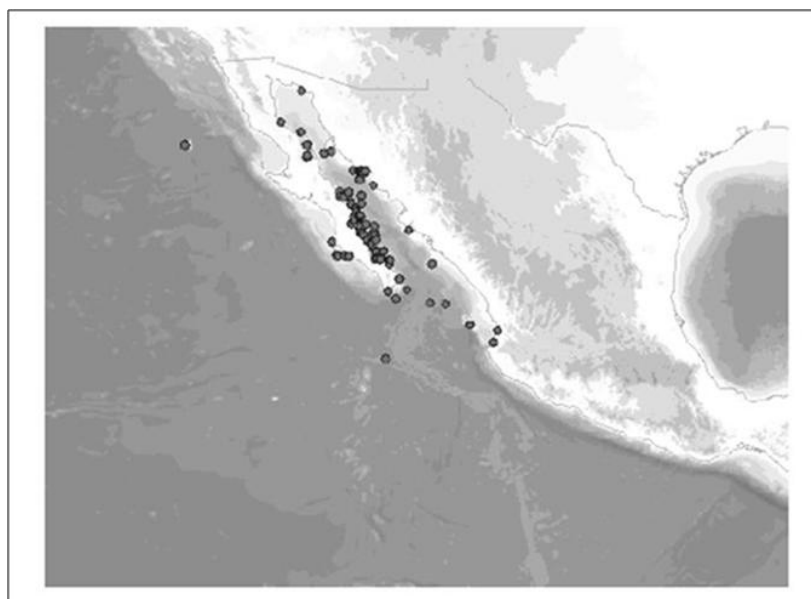


Fig. 2 Distribución geográfica de la cabrilla sardinera *Mycteroperca rosacea*

1.2.4 Antecedentes de investigación de la cabrilla sardinera

Sobre esta especie se han desarrollado varios trabajos, entre los principales tópicos que se han abordado son, la ecología de la especie donde se reporta que la cabrilla sardinera se alimenta de bancos de arenque (*Herengula thrissina*), anchovetas (*Cetengraulis mysticetus*) y otros peces (Peláez-Mendoza 1997) y los juveniles se alimentan durante el día de peces y crustáceos bentónicos (Hobson 1968). Los estudios de edad y crecimiento, reportan a la cabrilla sardinera como un pez de crecimiento lento, debido principalmente a sus hábitos alimenticios (Díaz-Uribe *et al.* 2001).

El reclutamiento de esta especie, se asocia a la relación de abundancia de la cabrilla sardinera y a la disponibilidad de zonas de sargazo como hábitat de asentamiento (Mendoza-Bustamante 2002); también se han realizado estudios de la reproducción de esta especie en la naturaleza, específicamente las agregaciones reproductivas, eventos que son

frecuentes en otras especies de meros así como reportes de gonocorismo (Erisman *et al.* 2007, 2008)

En el campo de la acuicultura los avances han sido significativos, en el área de reproducción se reporta la inducción al desove de la especie en organismos silvestres por medio de la hormona Gonadotropina coriónica humana (GCH) y hormonas liberadoras (LHRH-a) (Kiewek-Martínez 2004). Así mismo se ha descrito el desarrollo gonadal, el ciclo reproductivo de la especie, así como la concentración de esteroides sexuales: estradiol, testosterona y 11-ketosterona (Kiewek-Martínez 2009), además se comparó el efecto de las hormonas (LHRH-a) y (GCH) en la maduración final de los ovocitos. Por otro lado (Gracia-López *et al.* 2004a) realizaron la descripción del desarrollo embrionario y la morfología de los huevos y las larvas hasta el momento de la primera alimentación y (Gracia-López *et al.* 2004b) reportaron los efectos de la temperatura y la salinidad en los huevos y larvas de la especie. En el 2005 Gracia-López *et al.* Reporta la producción de juveniles en cautiverio de esta especie. Y Martínez-Lagos y Gracia-López (2009) describieron el desarrollo larvario y el modelo de crecimiento de la especie durante esta etapa. Además se han realizado trabajos sobre inmunología específicamente vacunación genética (Zepeda-Núñez 2007), susceptibilidad de juveniles de la especie a infecciones con bacterias *aeromonas hydrophila* (Gómez-Rojo 2007) y de la ingestión de probióticos para el mejor desarrollo del sistema inmune de los juveniles de esta especie criados en cautiverio (Reyes-Becerril *et al.* 2008). Además forma se han evaluado el efecto de la incorporación de levaduras en el alimento en la capacidad digestiva de la especie (Linares-Aranda 2007). En las experiencias con la especie en cautiverio, cabe destacar que la cabrilla sardinera es una especie de fácil adaptación al cautiverio, resistente a enfermedades y a la manipulación.

1.3 Situación actual de la acuicultura mundial

La acuicultura aporta 51.7 millones de toneladas en la producción mundial por pesca y acuicultura, lo que representa el 36 % del total generado por estos dos rubros en la producción de alimentos. La acuicultura sigue creciendo más que cualquier otro sector en la producción de alimentos de origen animal, a una tasa del 8.8% anual desde 1970 (FAO 2008). De esta forma se observa actualmente a la acuicultura como la principal vía para incrementar la producción de alimentos de origen acuático ya sea dulce acuícola o marinos. La maricultura ha presentado un desarrollo más lento que la acuicultura de agua dulce; sin embargo la tendencia mundial actual muestra un crecimiento sostenido del 5.8% en la maricultura en los últimos años (FAO 2008).

La acuicultura intensiva de peces marinos tiene como objetivo la domesticación y reproducción de especies con alto valor en el mercado (Tait y Hichman 2001) y aparece como una actividad adicional a las pesquerías, ya que se producen peces de los cuales las poblaciones naturales han declinado durante los últimos años debido a la degradación ambiental y a la sobre explotación (Billard 1989; Rottmann *et al.* 1991).

En la República mexicana, el mayor desarrollo logrado en el cultivo de peces marinos se encuentra en la parte noroeste del país, donde se han realizado diversos estudios en este campo. Podemos mencionar los trabajos realizados por el Instituto Nacional de la Pesca en el estado de Sonora y La Universidad de Baja California, donde se realizaron estudios para el cultivo de la *Totoaba macdonaldi* (Cisneros-Mata 1995; López *et al.* 2006) en el CIAD de Mazatlán, Sinaloa donde se ha desarrollado el cultivo del Botete diana (*Sphoeroides annulatus*) (Duncan *et al.* 2003; De la Parra *et al.* 2006); en El Centro Regional de Investigación Pesquera y el CICIMAR de La Paz, B.C.S. quienes desarrollaron

con éxito la metodología de cultivo de la cabrilla arenera (*Paralabrax maculatofasciatus*) (Avilés-Quevedo. 1995; Peña *et al.* 2003, 2004, 2005); en el CICESE de B.C. donde se trabaja exitosamente con el lenguado (*Paralichthys californicus*) y en el CIBNOR de la ciudad de la Paz B.C.S. donde se han desarrollado trabajos sobre el cultivo del pargo amarillo (*Lutjanus argentiventris*) (Muhlia *et al.* 2003; Guerrero-Tortolero *et al.* 1999; Serrano-Pinto y Caraveo-Patiño 1999) y la cabrilla sardinera (*Mycteroperca rosacea*) (Kiewek-Martínez 2004; Gracia-López *et al.* 2004a; Gracia-López *et al.* 2004b; Gracia-López *et al.* 2005; Kiewek-Martínez 2009; Martínez-Lagos y Gracia-López 2009).

1.3.1 Cultivo de los meros en el mundo

Los meros son peces de gran estima para el consumo humano y se les considera peces de primera calidad en todo el mundo, por lo cual su potencial de comercialización es alto (Akatsu *et al.* 1983; Heemstra y Randall 1993; James *et al.* 1998; Tucker 1999). Dentro de esta familia destacan los géneros: *Epinephelus*, *Mycteroperca*, *Plectropomus* y *Cromileptes*.

Los meros han sido cultivados en el sudeste asiático por mas de 15 años siendo *E. tauvina* la primera especie que se cultivo en granjas de Kuwait, Singapur y Tailandia (Spedicato *et al.* 1995). Alrededor de 20 especies han sido cultivadas a escala comercial dentro de éstas se encuentran: *E. Coioides*, *E. Malabaricus*, *E. Akaara*, *E. Striatus*, *E. Septemfasciatus*, *Cromileptes altivelis* y *M. microlepis* (Heemstra y Randall 1993). El principal problema es que los cultivos han dependido en gran medida de la captura de juveniles silvestres (Kuo *et al.* 1988; Tucker 1999; Tucker 2003), haciendo que la producción sea fluctuante, debido a la disponibilidad variable de semilla en el medio

natural. Además, la producción de semillas en los laboratorios no ha sido constante, porque no se cuenta con una tecnología definida (Lim 1993; James *et al.* 1998; Tookwinas 1990).

En la República Mexicana el consumo de cabrillas y meros es habitual tanto en el litoral Pacífico como en el Golfo de México y el Caribe, cuyo volumen de captura se estima en 16.8 toneladas con un valor de \$332.9 millones de pesos (SAGARPA 2007).

1.4 Ontogenia en peces

La ontogenia ó morfogénesis describe el desarrollo de un organismo, desde el óvulo fertilizado hasta su forma adulta este proceso se da en pasos múltiples conocidos como formación de patrones. Este continuo cambio estructural se da en los organismos, en cada momento, o como un cambio desencadenado por interacciones provenientes del medio donde se encuentre o como resultado de su dinámica interna. El desarrollo animal u ontogenia se describe en base a dos funciones principales:

1. La diferenciación celular a partir del huevo fecundado (cigoto) y organización de los diversos tipos celulares en tejidos y órganos (morfogénesis y crecimiento).
2. La reproducción que asegura la continuidad de la vida de una generación a la siguiente. (Solomon *et al.* 1998).

Para ser exitosos en la agro-industria es de vital importancia de conocer cada uno de los aspectos de la biología de las especies de interés durante su desarrollo. De esta forma en la actualidad, son frecuentes los estudios de este tipo en el desarrollo de la piscicultura marina especialmente en las especies que presentan un potencial de cultivo (Gisbert *et al.* 2002; Kunz 2004; Gisbert y Doroshov 2006).

Asimismo podemos mencionar que durante el desarrollo de los peces se han descrito dos tipos de ontogenia (Balon 1984); el primer tipo es la ontogenia indirecta, que

se caracteriza por tener cinco períodos, 1) embrionario, 2) larvario, 3) juvenil, 4) adulto y 5) senectud (Fig. 3); el segundo tipo es la ontogenia directa, que carece de un período larvario, por lo que al eclosionar el organismo ya presenta todas las características de un juvenil, como es el caso de los peces de la familia *poeciliidae* y algunas especies de cíclidos, entre otros (Kendall *et al.* 1984). En el presente trabajo nos enfocaremos únicamente a especies que presentan ontogenia indirecta, ya que la especie de estudio presenta este tipo de desarrollo.

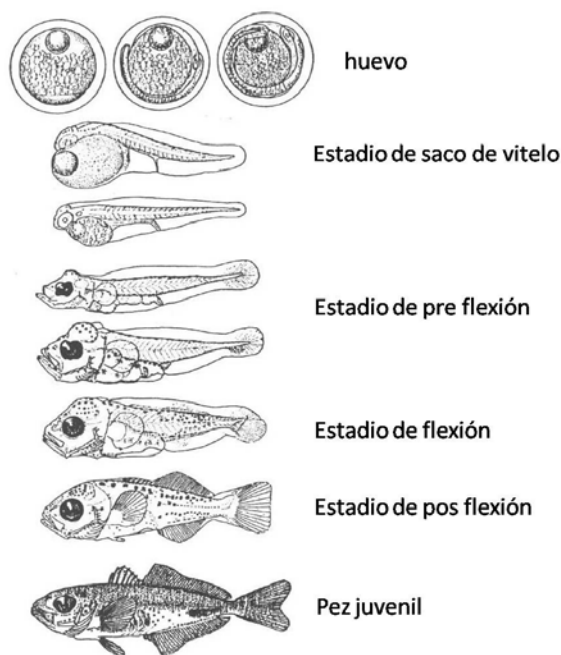


Fig. 3 Nomenclatura usada en los estadios tempranos de peces marinos de que presentan ontogenia indirecta Ej. macarela. (Modificado de Kendall *et al.* 1984)

1.4.1 Características de los huevos en los peces marinos y sus principales estrategias de incubación.

La mayoría de las especies de peces marinos que en la actualidad se trabajan en maricultura, presentan huevos de tipo planctónico, generalmente pequeños su tamaño puede variar de 600-2,000 μm de diámetro típicamente; la cabrilla sardinera presenta huevos con un diámetro de 840-880 μm (Kiewek-Martínez 2004).

En la mayoría de los peces teleósteos, los huevos constan de Corion (cascarón), el vitelo, embrión y uno o más glóbulos de aceite. El espacio perivitelino contiene fluidos que separan al corion de el vitelo y el embrión. El micrópilo es el poro por donde el esperma entra y fertiliza al huevo. El vitelo esta formado principalmente de proteínas que son utilizadas para el crecimiento. El aceite (triacilgliceroles) es una fuente de energía y ácidos grasos esenciales. Los aminoácidos libres también pueden ser utilizados como fuente energética (Finn y Fyhn 1995; Fyhn y Govonni 1995). Después de la fertilización de los huevos planctónicos, estos absorben agua en el espacio perivitelino, el micrópilo se cierra y el corion se endurece y su flotabilidad es positiva en el agua (Yamamoto y Kobayashi 1992).

En muchas de las especies de peces que tienen huevos del tipo pelágico, el diámetro de los huevos y el tiempo de incubación de los mismos se relacionan inversamente con la temperatura del agua (Duarte y Alcaraz 1989; Pepin 1991). En los peces de aguas cálidas y huevos del tipo planctónico, el tiempo de incubación puede ser de 10-48 horas después de la fertilización. En los laboratorios generalmente se utiliza la nomenclatura grados-día por ejemplo podemos mencionar la cabrilla sardinera [*Mycteroperca rosacea* (25 °C x 24 h) / 24 h = 25 grados día] sería el tiempo de incubación de los huevos de la cabrilla sardinera

24 horas a 25 grados. Pero también es importante mencionar que el proceso de incubación puede depender de otros factores además de la temperatura, estos factores pueden ser internos ó externos como ser: las secreciones de la hormona tiroides, salinidad, el pH interno y externo, la producción de enzimas previas a la eclosión (Brown y Bern 1988; Helvik *et al.* 1991; Luberda et al. 1993).

Los huevos y larvas de los peces marinos tienen varias características, que maximizan la supervivencia de la progenie en la naturaleza. Las principales estrategias de acuerdo al tipo de huevo utilizadas por los peces que actualmente se trabajan en acuicultura o en piscicultura de ornato son: los huevos que son transportados por sus progenitores durante todo el proceso de desarrollo embrionario como el caso de los caballitos de mar (*Hippocampus zosterae*); los huevos adhesivos que necesitan un sustrato o se depositan en el fondo como los huevos del pez globo (*Canthigaster calentini*); los huevos adhesivos que flotan en un conjunto como los huevos del pez escorpión (*Scorpaena guttata*); los huevos que se entierran donde encontramos un ejemplo en los huevos de los salmones del atlántico (*Salmo salar*); los huevos que se hunden como los huevos del la lobina estriada (*Morone saxatilis*) y los huevos del tipo planctónico que flotan libremente en la columna de como es el caso de la cabrilla sardinera (Tucker 1998).

1.4.2 Periodo embrionario

Se da como inicio de la ontogenia en peces, desde el momento de la fertilización de los huevos (Balon E. K. 1985) tomando este punto como partida, el período embrionario inicia una vez que el ovocito ha sido fecundado y termina cuando la larva ha absorbido completamente el vitelo y el glóbulo de aceite (Fig. 4). Este período se divide en tres fases:

a) la fase de segmentación, que inicia cuando se fecunda el óvulo y termina antes del cierre del blastoporo. Este proceso embriológico temprano que consiste en una serie de divisiones celulares (mitosis) del óvulo fecundado (cigoto) que se producen antes de la gastrulación y que se relacionan con la morfología del huevo y en particular con la cantidad de vitelo que contiene. Las células resultantes de la división del cigoto se denominan blastómeros y forman una masa compacta llamada mórula; a partir de ésta se forma la blástula y posteriormente la gástrula.

b) la fase embrión, que inicia con el cierre del blastoporo y termina con la eclosión de la larva. En este periodo se da la organogénesis es el conjunto de cambios que permiten que las capas embrionarias ectodermo, mesodermo y endodermo, se transformen en los diferentes órganos que conforman un organismo. Debemos recordar, que antes de esto, ocurre la formación de órganos rudimentarios, quiere decir, la formación de órganos sin forma ni tamaño definido.

c) la fase eleuteroembrión (embrión libre), que inicia con la eclosión de la larva y termina cuando se da la completa absorción del vitelo y glóbulo de aceite (Balon 1984). En este periodo, se dan cambios drásticos en el tamaño y forma de las larvas así como en su metabolismo y comportamiento. Generalmente estos eventos se dan en corto tiempo (Gisbert *et al.* 2002; Kunz 2004; Gisbert y Doroshov 2006).

En general, los huevos y eleuteroembriones de la mayoría de los peces marinos de aguas tropicales y sub-tropicales presentan características comunes como son: diámetro del huevo pequeño, tiempos de eclosión cortos, un vitelo restringido que dura poco tiempo, por lo que la alimentación exógena tiene que realizarse antes de que el organismo este totalmente formado.

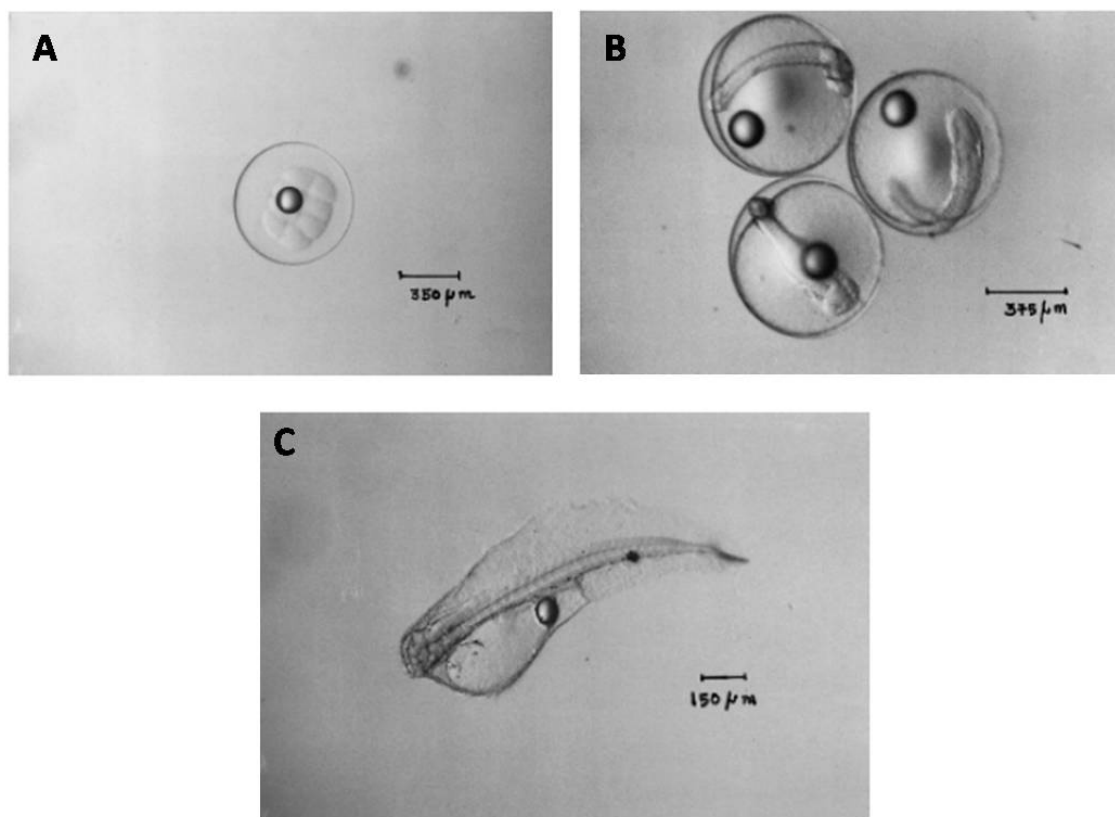


Fig. 4 Periodo embrionario en *Epinephelus merra*. (A) Fase de segmentación; (B) fase de embrión; (C) fase eleuteroembrión ó embrión libre (modificado de Jegadis *et al.* 2006).

1.4.3 Periodo larvario

Las larvas de peces que proceden de huevos planctónicos generalmente son pequeñas, delicadas y en su cultivo larvario requieren alimento vivo por 3-5 semanas y en algunos casos hasta 8 semanas o más. En la mayoría de especies con este tipo de larvas, estas son frágiles, con estrecha tolerancia a cambios en el medio ya sean estos físicos ó biológicos y usualmente es difícil desarrollar en los laboratorios larvas que provengan de huevos muy pequeños (<700 μm) (Tucker 1998).

Los principales problemas para el cultivo larvario de especies que presentan este tipo de larvas, están asociados al tamaño en larvas, de estos podemos mencionar el tamaño

de la boca, la cantidad de reservas en el vitelo y gota de aceite y la poca disponibilidad de presas pequeñas con una calidad nutricional adecuada.

El periodo larvario presenta 3 fases: a) la preflexión en la cual las larvas presentan el notocordio recto, que inicia a partir de la completa absorción de las reservas endógenas y termina hasta antes del inicio de la flexión del notocordio; b) la flexión ocurre cuando la larva presenta el notocordio que gira hacia arriba en su parte final y el esqueleto caudal se está formando; este inicia a partir de la flexión del notocordio y termina hasta la completa formación de la placa hipúrica; c) en la posflexión la larva presenta el notocordio que llega a su posición final, el esqueleto caudal esta formado en su mayoría y la placa hipúrica esta totalmente formada. En este punto la larva esta casi completamente formada, aunque todavía no presenta todas las características morfológicas finales de un juvenil, aunque su capacidad de búsqueda y captura es elevada (Fig. 5) (Kendall *et al.* 1984., Ortiz-Galindo 1991., Tucker 1998).

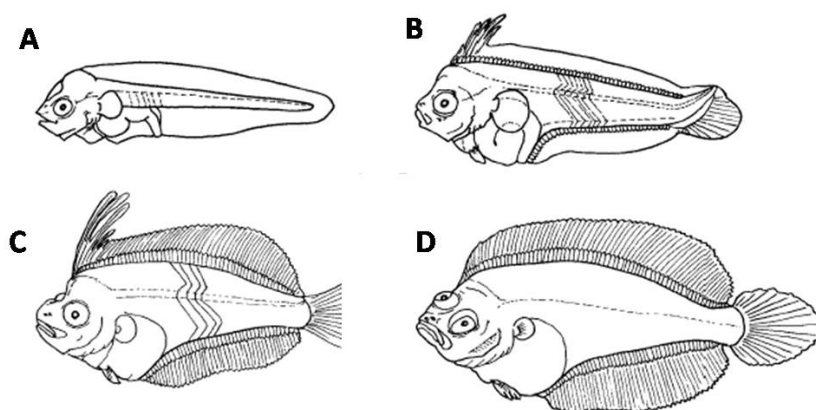


Fig. 5 Distintas fases del periodo larvario de *Paralichthys californicus*: A-pre flexión; B-flexión; C-pos flexión; D- pez juvenil (modificado de Gisbert *et al.* 2002).

La mayoría de las larvas de peces marinos que se trabajan en maricultura tienen un tamaño de 1-5 mm de longitud total (LT) al eclosionar, nacen ciegas, nadan relativamente bien, pueden tomar su primer alimento exógeno entre el primer y séptimo día de vida posterior a la eclosión, dependiendo la especie. Los ojos se pigmentan y están funcionales generalmente justo antes de la primera alimentación (Blaxter 1986). Los sentidos del gusto y del olfato se desarrollan bien hasta el día 16 en muchas especies (Op. cit.). El intercambio gaseoso ocurre a través de la piel en los primeros días de vida y sus branquias son funcionales hasta que el proceso de transformación está bien avanzado y el intercambio gaseoso a través de la piel no es suficiente para el tamaño del pez (Tucker 1998).

En las larvas de peces marinos más estudiadas el desarrollo del sistema digestivo puede variar de 3 a 8 semanas según la especie, en los primeros días de vida la larva no tiene todas las enzimas necesarias para realizar una completa digestión; en estas además la mayoría de las especies poseen el hígado y el páncreas funcionales en la primera alimentación pero no las glándulas gástricas del estómago las cuales son funcionales hasta después de completada la transformación (Govoni *et al.* 1986). Algunas especies como el salmón y la tilapia tienen su sistema digestivo totalmente desarrollado en la primera alimentación y por esta razón pueden comer alimento balanceado.

Durante el desarrollo embrionario y la primera alimentación el incipiente tracto digestivo se diferencia en bucofaríngeo, tracto digestivo anterior, tracto digestivo medio y tracto digestivo posterior. Durante la transformación del tracto digestivo anterior se forma el esófago y el estómago, del tracto digestivo medio se forma el intestino anterior y del tracto digestivo posterior se forma el intestino posterior (Op. cit.).

En la mayoría de las especies de peces marinos, incluyendo las que son herbívoras, sus larvas son carnívoras, debido a que: el alimento de origen animal es más nutritivo, las larvas no tienen la capacidad de digerir la celulosa presente en las algas y por último el zooplancton contiene varias enzimas que la larva aprovecha en los procesos digestivos. En el medio silvestre, la dieta de las larvas de peces marinos es muy diversa y en ella se pueden incluir: diatomeas, dinoflagelados, ciliados, rotíferos, cladóceros, copépodos, tintinidos, huevos de bivalvos, huevos de peces, poliquetos, lamelibranquios, gasterópodos y decápodos (Blaxter y Hunter 1982; Ozawa *et al.* 1991; Sánchez-Velasco y Norbis 1997). En la mayoría de los casos las larvas no aceptan alimento artificial en su primera alimentación, no sobreviven o no tienen un buen desarrollo. Pero algunas especies aceptan el alimento inerte durante o antes del proceso de transformación, como es el caso de *S. ocellatus* (Holt 1993; Lazo *et al.* 2000) y la cabrilla sardinera (Martínez-Lagos y Gracia-López 2009)

El periodo de juvenil se considera cuando los peces han completado el proceso de transformación, entendiéndose como tal cuando las larvas tienen la misma forma y elementos que un pez adulto, como las espinas, radios, huesos, y están totalmente desarrolladas sus capacidades tanto de escape a predadores como de captura de presas. En los peces de aguas cálidas el tiempo varía de 20-60 días (Tucker 1998).

El período adulto inicia al detectarse la aparición de las gónadas, así como los caracteres primarios y secundarios para la reproducción. Este período puede iniciar a los pocos meses de edad o hasta varios años después, y depende de la especie. Por ejemplo, en la tilapia que madura a los 3 ó 4 meses después de haber nacido, o como en la lobina gigante *Stereolepis gigas* que tarda hasta 20 años en madurar. Asimismo, un aspecto

relevante de este período, es que la tasa de crecimiento disminuye considerablemente, debido a que gran parte de la energía que se utilizaba para crecimiento se canaliza para la formación de las gónadas y de los gametos. El período senectud se caracteriza porque la capacidad reproductiva ha disminuido o finalizado; asimismo, la tasa de crecimiento se ha reducido considerablemente para dar paso a la muerte del organismo (Kendall *et al.* 1984).

Durante el proceso de desarrollo larvario de los peces marinos en los laboratorios, conocido generalmente como larvicultura se han identificado una serie de periodos o puntos críticos, durante los cuales la cohorte de las larvas puede llegar a una supervivencia cero. Para evitar esta situación es necesario que existan condiciones físicas y biológicas apropiadas durante todo el desarrollo larvario para así obtener una mayor supervivencia de la cohorte. Cronológicamente se pueden mencionar:

1. La fertilización. En este punto se debe de tomar en cuenta, la calidad de los gametos, la temperatura y la salinidad. El correcto cronometraje del tiempo durante el proceso en el cual los espermatozoides se unen con los huevos, esta actividad es muy importante si los gametos son producto de una inducción hormonal. El manejo apropiado del desove si este se obtuvo de manera espontanea, en sistemas de flujo abierto o de recirculación.
2. La incubación de los huevos. En este punto se toma en cuenta la calidad de los embriones, una correcta temperatura, la limpieza del tanque, y eliminación de las enzimas y materia orgánica posterior a la eclosión mediante el recambio total de agua, ya que debe haber una total ausencia de sustancias toxicas y una correcta intensidad de luz, esto es importante en algunas especies.

3. La primera alimentación. En este punto se debe tener en cuenta la fortaleza o calidad de las larvas en los primeros días de vida, su forma, tamaño, actividad o vitalidad; el tipo, calidad y cantidad de alimento a suministrar; acompañado de la apropiada iluminación y la correcta calendarización de las actividades durante este periodo.
4. El agotamiento del vitelo y el glóbulo de aceite. Se debe observar si existe una adecuada cantidad de vitelo y aceite hasta que exista una ingestión apropiada de alimento exógeno, una correcta temperatura y una cantidad apropiada de alimento exógeno durante el proceso.
5. El llenado de la vejiga natatoria. En este punto se debe observar la vitalidad de las larvas, la intensidad de la luz, la apropiada circulación de agua, la captura y eliminación de la capa de partículas de cualquier naturaleza en la superficie del agua.
6. El cambio de dietas (destete o deshabitación alimentaria). Se debe observar la compatibilidad digestiva, el correcto tamaño, la disponibilidad, y calidad del alimento, el tiempo correcto del periodo de transición entre dos tipos de alimento y/o co-alimentación.
7. Transición de la respiración cutánea a branquial. En este punto es necesario observar una correcta oxigenación del medio y un sano desarrollo general de las larvas.
8. Transformación. En este punto una adecuada separación por tallas puede disminuir pérdidas considerables por canibalismo.

1.4.4 Modelo de crecimiento larval

En las fases de embrión libre y larva de los peces que presentan ontogenia indirecta, las larvas sufren cambios drásticos en el tamaño y forma del cuerpo, así como en su metabolismo y comportamiento. Generalmente estos eventos se dan en corto tiempo (Gisbert *et al.* 2002; Kunz 2004; Gisbert y Doroshov 2006). Estos cambios en la forma y tamaño del cuerpo definen el modelo de crecimiento que generalmente es del tipo alométrico (Osse y van den Boogart 1995). Los parámetros ambientales pueden afectar el desarrollo en las primeras etapas de vida de los peces, donde un inadecuado control de estos parámetros puede generar estrés en las larvas. Interfiriendo en su normal desarrollo y generando problemas de deformaciones, crecimiento y supervivencia (Tucker 1998; Gisbert *et al.* 2002).

El conocimiento de los procesos en la ontogenia temprana de los peces, como la morfogénesis, favorecerá el desarrollo de las técnicas de producción, ya que es en esta etapa de los cultivos en donde ocurren las mayores mortalidades (Kohno *et al.* 1997). Así también el estudio del modelo de crecimiento, facilitará la detección de defectos y aportará conocimiento para mejorar las técnicas de cría, tanto en el control de los parámetros ambientales como en las prácticas de alimentación.

Los modelos morfométricos o de crecimiento como el modelo de Von Bertalanffy pueden ser aplicados en la industria pesquera (Sparre y Vennema 1997) y acuícola para comparar los lotes de diferentes cohortes, así como la sustentabilidad y proyección de desarrollo en los cultivos (Kohno *et al.* 1990; Hseu, *et al.* 2003). También, los marcadores morfológicos y funcionales, se pueden utilizar como indicadores de un crecimiento óptimo aplicando las técnicas de cultivo larvario (Gisbert *et al.* 2002).

1.5 Ontogenia digestiva

La optimización de las técnicas de cultivo larvario en peces marinos requiere un conocimiento profundo sobre la biología y fisiología de las especies de interés; de esta forma es posible adecuar las prácticas de manejo para incrementar la supervivencia en los cultivos. Uno de los principales puntos a conocer en las especies es su capacidad digestiva en los primeros días de vida y de esta forma proporcionar a las larvas los alimentos adecuados para una buena nutrición, ya que los primeros días son un periodo crítico para la supervivencia en un pez, especialmente cuando se terminan sus reservas vitelinas y comienza su alimentación exógena. Es importante mencionar que en este periodo existen limitaciones morfológicas como el tamaño de la boca (Shirota 1970; Meza-González *et al.* 2002), falta de desarrollo en sus estructuras anatómicas que facilitan la captura de presas, como: la formación de aletas y ojos. Además pueden existir limitaciones fisiológicas como el desarrollo insipiente de las glándulas digestivas, que impide a la larva tener la capacidad enzimática para digerir los alimentos ingeridos (Planas y Cunha 1999; HamLin *et al.* 2000).

Como parte de los estudios para mejorar el conocimiento sobre el desarrollo ontogénico de los peces marinos que se trabajan actualmente en acuicultura se han hecho trabajos descriptivos sobre el sistema digestivo de varias especies como: *Scophthalmus maximus* (Cousin y Laurencin 1985), *Paralichthys californicus* (Gisbert *et al.* 2004) y *Seriola lalandi* (Chen *et al.*, 2006). Además de los análisis morfológicos, el conocimiento de las capacidades digestivas de las especies de interés se debe fortalecer con estudios bioquímicos que confirmen lo que morfológicamente se ha detallado. Este tipo de estudios se ha realizado en especies que se trabajan con éxito actualmente en la acuicultura o que

presentan un alto potencial de cultivo como *Scophthalmus maximus* Linnaeus, 1758 (Cousin *et al.* 1987); *Dicentrarchus labrax* Linnaeus, 1758 (Infante y Cahu 1994); *Paralichthys californicus* Ayres, 1859 (Álvarez-González *et al.* 2006). Además, este tipo de trabajos también nos proporcionan información que se puede utilizar como un indicador del estado nutricional de las larvas (Ueberschär 1993, Cara *et al.* 2004) y generan el conocimiento necesario para realizar las prácticas de alimentación adecuadas en el mejor momento y con alimentos apropiados (Gisbert *et al.* 2004, Cahu y Zambonino 1994, 2001).

1.5.1 Bioquímica de la nutrición

Las enzimas son catalizadores biológicos que incrementan la velocidad de una reacción, sin verse alterada ella misma en el proceso global. La mayor parte de los catalizadores biológicos son proteínas, las cuales se han clasificado por parte de la Comisión de Enzimas (EC) de la Unión Internacional de Bioquímica en seis grandes grupos (Lehninger 1984; Mathews y Van Holde 1998):

1. Óxido reductasas: que catalizan reacciones de oxidación-reducción.
2. Transferasas: que catalizan transferencias de grupos funcionales de una molécula a otra.
3. Liasas: que catalizan eliminaciones de un grupo o adiciones a un grupo a un doble enlace, u otras rupturas que implican un reordenamiento electrónico.
4. Isomerasas: que catalizan reordenamientos intramoleculares.
5. Ligasas: que catalizan reacciones en las que se unen dos moléculas.
6. Hidrolasas: que catalizan rupturas hidrolíticas.

En el caso particular de las enzimas digestivas, muchas de ellas son del grupo 6, y se han dividido en los siguientes grupos que se describen a continuación en función del tipo de sustrato que hidrolizan.

1.5.2 Las proteasas

Las proteasas son enzimas que catalizan la hidrólisis de los enlaces peptídicos que forman la estructura primaria de las proteínas, y están presentes en muchos organismos (Dixon y Webb 1979). Algunas proteasas están implicadas en procesos como la digestión, la activación de pro-enzimas y pre-hormonas y muchos otros más (Stroud 1975).

La clasificación de las proteasas, por ser hidrolasas específicas de enlaces peptídicos, se agrupan bajo el código EC 3.4. Existen dos subgrupos: las exopeptidasas, que hidrolizan enlaces peptídicos entre aminoácidos terminales (extremo amino o carboxilo de la proteína), y se agrupan bajo la categoría EC 3.4.11-19. Las endopeptidasas, hidrolizan enlaces peptídicos internos que pertenecen a la categoría EC 3.4.21-24. Asimismo, se clasifican de acuerdo a su mecanismo de acción, donde se reconocen 4 grupos principales:

1. Serina-proteasas (EC 3.4.21): que poseen un grupo serina en el centro activo, así como histidina y ácido aspártico.
2. Cisteína-proteasas (EC 3.4.22): que se caracterizan por la presencia del grupo cisteína (-SH) en su sitio catalítico.
3. Proteasas ácidas o aspárticas (EC 3.4.23): que se caracterizan por la presencia de ácido aspártico en el centro activo, y poseen máxima actividad a pH ácido.
4. Metal-proteasas (EC 3.4.24): poseen un residuo de ácido glutámico en el centro activo, y requieren de un catión divalente (Zn^{+2} , Ca^{+2} ó Mg^{+2}) para catalizar la hidrólisis del enlace peptídico.

Para profundizar en la clasificación se han propuesto 6 grupos en función de su secuencia aminoacídica (Tabla 1), las cuales comparten hasta un 50% de esta secuencia (Dumermuth *et al.* 1991). Dentro del grupo de las endoproteasas se encuentran la pepsina (EC 3.4.23.1), gastricina (EC 3.4.23.3) y la quimosina o renina (EC 3.4.23.4) que son proteasas ácidas presentes en el jugo gástrico de muchos organismos.

De éstas, la proteasa ácida más importante es la pepsina, la cual es una enzima aspártica que hidroliza a su máxima capacidad cuando se encuentra a pH ácido (2) y requiere que el residuo 2 de la cadena peptídica sea fenilalanil, tirosil o triptofanil. Este tipo de enzimas han sido purificadas con bastante éxito a partir de extractos derivados de vacas, pollos y peces.

Tabla I Clasificación de las proteasas por familias.

Clase	Enzima	Origen
<i>Serina I</i>	tripsina	páncreas
	quimotripsina	páncreas
<i>Serina II</i>	Subtilisina	<i>Bacillus subtilis</i>
<i>Cisteína</i>	papaína	<i>Papaya latex</i>
	quimopapaína	<i>Papaya latex</i>
	ficina	<i>Ficus latex</i>
	bromelaína	<i>Ananas comosus</i>
	catepsina B	varios tejidos
<i>Ácidas</i>	pepsina	jugo gástrico
	quimosina	jugo gástrico (ind.jóvenes)
	catepsina D	Hígado, bazo
<i>Metal I</i>	carboxipeptidasa A	Páncreas bovino
<i>Metal II</i>	Termolisina	<i>Bacillus themoproteolyticus</i>

En el intestino de muchas especies se ha detectado otro tipo de enzimas que funcionan a pH alcalino como la tripsina (EC 3.4.21.4.) y la quimotripsina (EC 3.4.21.1). Estas enzimas son las serina proteasas (endopeptidasas) más ampliamente estudiadas, ya

que participan fuertemente en la digestión de proteínas en todos los animales. Por supuesto no son las únicas y existen muchos tipos que también están involucradas dentro de este proceso, aunque en menor porcentaje. La tripsina es una endopeptidasa que tiene la capacidad de hidrolizar enlaces peptídicos cuando el residuo 1 está conformado por arginina o lisina. Mientras que la α -quimotripsina es capaz de hidrolizar enlaces peptídicos cuando el residuo 1 contiene tirosina, fenilalanina o triptófano (Whitaker, 1994). También actúa sobre amidas y ésteres. Las catepsinas son enzimas relacionadas con los procesos de digestión intracelular.

En el caso de las exoproteasas, se pueden mencionar las aminopeptidasas (EC 3.4.11) las cuales catalizan la hidrólisis de los restos aminoacídicos, concretamente desde el extremo amino de un péptido. Se clasifican en función de los requerimientos de iones metálicos (Mn^{2+} , Mg^{2+} , Zn^{2+} o Co^{2+}) y la especificidad por determinados dipéptidos (Behal *et al.* 1965). Entre sus diversas funciones destacan: la maduración de proteínas, degradación terminal de proteínas, regulación hormonal y control del ciclo celular. En el caso concreto de la leucina aminopeptidasa, se ha relacionado su actividad en la membrana de los enterocitos con el estado nutricional de los organismos en estadios larvarios tempranos. Las carboxipeptidasas son enzimas que liberan residuos aminoacídicos del extremo carboxiterminal de los péptidos y proteínas. Se conocen dos familias de carboxipeptidasas: las serina carboxipeptidasas (EC 3.4.16), que contienen un residuo de serina en su centro activo y las metalo carboxipeptidasas (EC 3.4.17), que requieren de iones Zn^{+} para ser activas.

1.5.3 Las amilasas

Las amilasas catalizan la hidrólisis del enlace α 1-4 del almidón y glucógeno. Se dividen en alfa (α) y beta (β), o endo y exo amilasas. La α -amilasa (EC 3.2.1.1.) está presente en el jugo pancreático de gran cantidad de animales (Archibal 1987), ya que hidroliza indistintamente enlaces a lo largo de la cadena del polímero hidrocarbonado, liberando moléculas de glucosa y maltosa. Por su parte la β -amilasa hidroliza a los carbohidratos por el extremo no reductor, y se restringen exclusivamente al reino vegetal (Hirikado *et al.* 1994). En las larvas de peces marinos esta enzima generalmente presenta una actividad alta en los primeros estadios del desarrollo larvario dado que es utilizada en la catálisis del glucógeno en las larvas; pero se le da mayor énfasis a su estudio por la importancia que tiene en la catálisis de carbohidratos, determinando la posible utilización de ingredientes en la formulación de dietas para los peces.

1.5.4 Las lipasas

Estas enzimas (EC 3.1.1.3) se han descrito en varios tejidos animales (páncreas, plasma sanguíneo, saliva y jugo pancreático). En organismos superiores, la lipasa pancreática actúa específicamente sobre los enlaces éster exteriores (enlaces a 1 y 3), por lo que se produce principalmente una mezcla de ácidos grasos y monoglicéridos. La hidrólisis digestiva de los triglicéridos es activada por el ion Ca^{2+} , y en presencia de un factor llamado colipasa (Canioni *et al.* 1977). La acción de la lipasa sobre su sustrato se ve enormemente favorecida por la existencia de la interface agua-lípido, la cual es formada en el intestino gracias a la acción emulsionante de las sales biliares o sus análogos. La colipasa actúa preservando la lipasa de la desnaturalización, y favoreciendo su adsorción al sustrato. Algunas esterases (EC 3.1.1.1), que preferentemente actúan sobre ésteres simples de ácidos

grasos con bajo peso molecular, poseen la capacidad, al igual que las lipasas, de hidrolizar triglicéridos. Sin embargo, se distinguen de éstas porque hidrolizan sustratos solubles. En las larvas de peces marinos esta enzima es muy importante ya que la mayor parte de los recursos endógenos de las larvas son lípidos (ácidos grasos poliinsaturados) se destacan la lipasa y fosfolipasa A2 que incrementan conforme el pez se desarrolla (Izquierdo *et al.* 2000).

1.5.5 Las fosfatasas ácidas y alcalinas

Las fosfatasas ácida y alcalina (EC 3.1.3.2 y 3.1.3.1) catalizan la separación de fósforo inorgánico (P) a partir de fosfato orgánico. Se encuentran en los epitelios intestinales y en diferentes capas tisulares del estómago. Su papel fisiológico en los vertebrados superiores está relacionado con los procesos de mineralización de los huesos (Harris 1989), así como en procesos de transporte a través de membrana. De hecho, ambas fosfatasas se asocian con el transporte activo de glucosa, proteínas y lípidos, e incluso de agua además iones en el caso de la fosfatasa alcalina (Dupuis *et al.* 1991).

1.5.6 Estudios de caracterización enzimática

De acuerdo a la Comisión de Enzimas (EC) de la Unión Internacional de Bioquímica la actividad enzimática se expresa en unidades internacionales (U), que representan la cantidad de enzima que cataliza la formación de 1 μmol de producto por minuto a 25°C.

La actividad específica se expresa en unidades por miligramo proteína, gramo de tejido fresco o por mililitro de homogenado enzimático, que constituye una medida de pureza de la preparación enzimática. Por lo anterior, la actividad específica se calcula bajo

condiciones estándar, a una temperatura determinada (generalmente 25, 30 ó 37 °C) y en presencia de sustrato saturantes.

Los estudios de caracterización de las distintas enzimas digestivas son esenciales si se quiere entender los tipos y modos de acción, así como el nivel de actividad que representan. Para la caracterización, se pueden realizar diversos ensayos, técnicas electroforéticas, caracterización mediante inhibidores específicos y afinidad por sustratos específicos, a esta última pertenecen las técnicas que se utilizaron en el desarrollo del presente trabajo.

1.5.7 Efecto del pH sobre la actividad y estabilidad de la enzima

La mayoría de las enzimas poseen un pH característico en el que su actividad es máxima y a ese pH sus centros activos presentan una adecuada conformación iónica para llevar a cabo la catálisis con eficiencia. De este modo, cada enzima presenta un determinado perfil de actividad con respecto al pH. En la medida que las enzimas están por fuera del pH ya sea fisiológico u óptimo, su estabilidad puede variar al afectar su conformación secundaria, terciaria y/o cuaternaria. Así, la mayoría de las enzimas sufren desnaturalizaciones irreversibles en soluciones muy ácidas o alcalinas (Ásgeirsson *et al.* 1995).

1.5.8 Efecto de la temperatura sobre la actividad y estabilidad de la enzima

El punto óptimo aparente de temperatura es un parámetro operacional más que una característica fisiológica de la enzima, dado por el aumento de actividad con la temperatura ($Q_{10} \approx 2.0$), y por la posterior pérdida de la actividad de la enzima seguida por su desnaturalización térmica fuera de su intervalo de operación, ya que al absorber demasiada

energía, los enlaces no covalentes que mantienen su estructura terciaria se rompen y la enzima se desnaturaliza. El verdadero óptimo, es aquel valor de temperatura al cual la enzima no solamente muestra una actividad alta, sino también una alta estabilidad a lo largo del tiempo.

1.5.9 Afinidad por sustratos específicos

Se han obtenido un gran número de sustratos específicos, tanto naturales como sintéticos, que permiten establecer el tipo de catálisis que se produce en un extracto multienzimático. Las proteasas, tienen la capacidad de hidrolizar pequeñas moléculas sintéticas, de manera que se puede determinar la especificidad por sustrato y las propiedades cinéticas (Lehninger 1984). Estos sustratos sintéticos están formados por un aminoácido, que varía según la enzima, unido a un grupo cromogénico simulando un enlace peptídico. Cuando la enzima hidroliza esta unión, aparece un compuesto que puede cuantificarse mediante métodos espectrofotométricos o fluorométricos, siendo esta la metodología que emplearemos para determinar la actividad de las diversas enzimas digestivas involucradas durante la ontogenia inicial de la cabrilla sardinera.

1.5.10 Descripción del sistema digestivo en los peces

El sistema digestivo es uno de los aspectos más estudiados en los peces utilizando como herramienta la histología (Curry 1939; Sis *et al.* 1979; Gisbert *et al.* 2004). Generalmente los estudios en el sistema digestivo de los teleósteos se dividen en dos unidades funcionales:

1. Conducto alimentario o tracto gastrointestinal, que sirve como un compartimiento para la asimilación de los nutrientes obtenidos de los alimentos.

2. Las glándulas asociadas, que participan en los procesos digestivos aportando las enzimas que facilitan la digestión.

El tubo digestivo procede embriológicamente del endodermo histológicamente está formado por cuatro capas concéntricas (Fig. 6) que son de adentro hacia afuera:

1. La capa interna o mucosa (donde pueden encontrarse glándulas secretoras de moco y HCl vasos linfáticos y algunos nódulos linfoides); incluye una capa muscular interna compuesta de una capa circular interna y una longitudinal externa de músculo liso.
2. La capa submucosa compuesta de tejido conectivo denso irregular fibroelástico. Esta capa contiene el llamado plexo submucoso de Meissner, que es un componente del sistema nervioso entérico y controla la motilidad de la mucosa y en menor grado la de la submucosa, y las actividades secretoras de las glándulas.
3. La capa muscular externa que esta compuesta por una capa circular interna y otra longitudinal externa de músculo liso. Esta capa muscular tiene a su cargo los movimientos peristálticos que desplazan el contenido de la luz a lo largo del tubo digestivo. Entre sus dos capas se encuentra otro componente del sistema nervioso entérico, el plexo mientérico de Auerbach, que regula la actividad de esta capa.
4. La capa serosa o adventicia. Se denomina según la región del tubo digestivo que reviste, como serosa si es intra-peritoneal o adventicia si es retro-peritoneal. Esta capa esta conformada por un tejido conectivo laxo. La serosa aparece cuando el tubo digestivo ingresa al abdomen, y la adventicia pasa a ser reemplazada por el peritoneo (Groman 1982).

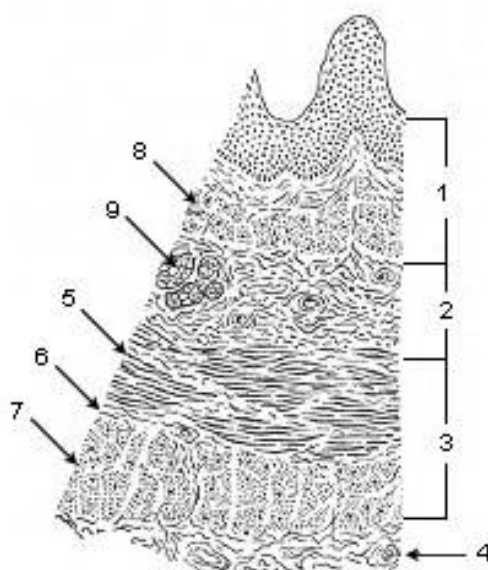


Fig. 6 Corte transversal del tracto gastrointestinal (sección del esófago), principales componentes del tracto digestivo: 1- capa mucosa, 2- capa submucosa, 3- capa muscular, 4- capa serosa ó adventicia, 5- musculo estriado, 6- musculo estriado y liso (zona de transición), 7- musculo liso, 8- lamina muscular, 9 – glándula secretora de moco

En el conducto alimentario generalmente se distinguen 5 regiones distintas, la cavidad oral, la faringe, esófago, estomago é intestino. La cavidad oral y la faringe, contienen los dientes y los arcos branquiales todos ellos son cónicos (Fink 1981). La mucosa de la boca, cavidad bucal, y faringe esta compuesta por epitelio escamoso estratificado. El esófago es corto comienza en la faringe y continua hasta el cuerpo ventricular del estómago, generalmente con cuatro capas concéntricas, la mucosa, submucosa, túnica muscular y serosa forman el tracto digestivo de los peces, estas cuatro capas están presentes en el esófago. En el estómago la mucosa gástrica presenta dos áreas histológicamente distintas, la primera es la región del fundus que esta formada por un epitelio simple columnar, las glándulas gástricas tubulares y una delgada lamina propia y la

segunda es la región pilórica que no contiene glándulas gástricas, pero presenta un complejo de pliegues en esta región hasta llegar al esfínter pilórico (Op. cit.).

El intestino anterior, se origina inmediatamente en la parte posterior del esfínter pilórico, su principal diferencia histológica con respecto al estómago es que decrece la submucosa, el tejido muscular y aumenta el tamaño de los pliegues hacia el interior del intestino, formados en su mayor parte por epitelio columnar. Es difícil separar histológicamente el intestino de la sección del recto, una de las principales diferencias es el incremento de células caliciformes en una proporción que duplica las células caliciformes que se observan en el intestino, además los pliegues intestinales primarios y secundarios disminuyen su tamaño al aproximarse al recto, en la poro anal las células caliciformes están ausentes y esta región está cubierta por tejido tegumentario.

1.6 Importancia de los factores ambientales en el cultivo larvario de peces marinos

En el cultivo larvario de peces marinos, el efecto de los parámetros ambientales reviste una gran importancia. Kinne (1977) incluyó: la nutrición, la iluminación, el fotoperíodo, temperatura, salinidad, turbulencia, gases disueltos, requerimientos de espacio y calidad del agua como parte importante en el ambiente. El no controlar de forma adecuada estos aspectos pueden generar situaciones de estrés en las larvas y esto puede interferir en su resistencia a enfermedades, desarrollo normal, aprovechamiento del alimento, crecimiento y supervivencia (Tucker 1998). En la actualidad, por medio de la tecnología disponible, es posible imitar las condiciones del medio natural en los laboratorios de larvicultura de peces marinos (hatchery) y de esta forma poder dar a las larvas las mejores condiciones ambientales, tanto físicas como biológicas que favorezcan su supervivencia en las diferentes etapas de desarrollo en el cultivo, disminuyendo todas las

situaciones de estrés que se puedan generar. Para este propósito es necesario profundizar en el conocimiento sobre los efectos de los distintos parámetros ambientales en las larvas cultivadas, ya que la producción de alevines en los laboratorios se ve limitada por las altas mortalidades en los cultivos larvales que se realizan de forma intensiva (Sweetman 1992; Abellán 2000; Rueda y Martínez 2001). Uno de los principales problemas a resolver para solventar este problema es que las larvas realicen una primera alimentación efectiva. Dos de los aspectos más estudiados son el tipo de presa a suministrar a las larvas y la intensidad de la luz durante el cultivo larvario (Peña *et al.* 2004; Wilcox *et al.* 2006; Giménez y Estévez 2008). Dado que las larvas de peces son predadores visuales, en la mayor parte de las ocasiones, la intensidad de la luz juega un papel importante para que las larvas puedan realizar su primera alimentación (Burke *et al.* 2005; Peña *et al.* 2004; Downing y Litvak 2001). En repetidas ocasiones se ha demostrado que es necesario además de una luz adecuada, el adecuado tamaño, calidad y cantidad de las presas para que las larvas sobrevivan a este periodo crítico de su desarrollo larval (Ricci *et al.* 2003; Koumoundouros *et al.* 2004; Evjemo *et al.* 2004; Peña *et al.* 2005a).

Parte de este trabajo se enfoca en estudiar el efecto de tres de los parámetros ambientales que pueden afectar significativamente la supervivencia en los cultivos larvales en *Mycteroperca rosacea* durante su primera alimentación: la intensidad de luz en los cultivos, el tipo de presa y la densidad de presas disponibles.

1.6.1 Intensidad de luz

Entre los factores ambientales que más influencia tienen sobre el desarrollo de las larvas de peces, se encuentra la iluminación, ya que éstas, son predadoras visuales. Para ellas la selección, localización y ataque a las presas depende mucho de la intensidad de la

luz (Downing y Litvak 1999). Además una intensidad de luz apropiada puede favorecer el crecimiento de las larvas de peces como en el caso del burbot *Lota lota* (Shiri Harzevili *et al.* 2004). La intensidad de luz se relaciona con el incremento de la actividad y la efectividad de la alimentación, hasta cierto punto ya que un exceso puede ser causa de estrés (Tucker 1998). Entre los principales problemas que se asocian a una intensidad de luz no apropiada se pueden mencionar: malformaciones, alteraciones en la vejiga natatoria y altas mortalidades, especialmente en las larvas de pocos días de eclosionadas con pigmentación escasa (Nash *et al.* 1974; Alessio 1974; Estévez y Planas 1987; Teng *et al.* 1999). La dirección de la iluminación, su fuente, intensidad, uniformidad y fotoperíodo son igualmente importantes y deben tomarse en consideración (Álvarez-Lajonchere y Hernández-Molejón 2001).

Se han logrado buenos resultados con el empleo de luz natural, mayormente difusa, atribuyéndose estos resultados a la acción germicida de los rayos U.V., la mayor intensidad luminosa, o al fotoperíodo natural de la época (Op cit). En los casos de iluminación artificial (Tucker 1998) recomienda utilizar lámparas con espectro similar al natural. La mayoría de los estudios reportan una intensidad de luz entre los 1,000 y 3,000 lux, siendo éste el intervalo recomendado por Moretti *et al.* (1999) para *S. aurata* hasta los 25 días después de la eclosión. Utilizando la técnica de agua verde, la intensidad de la luz debe ser el doble que con agua clara, por el efecto de la atenuación de la luz (Álvarez-Lajonchere y Hernández-Molejón 2001). El fotoperíodo es un aspecto que se debe tener en cuenta y varía en diversos estudios y tecnologías. En los últimos años, se ha implementado luz continua en los primeros días para propiciar el establecimiento eficiente de la alimentación exógena,

y posteriormente periodos de luz y oscuridad (Álvarez-Lajonchere y Hernández-Molejón 2001; Peña *et al.* 2004, 2005).

1.6.2 Alimento vivo en la larvicultura de peces marinos

En la naturaleza, la dieta de las larvas de peces marinos se compone de complejas redes tróficas que cambian en función del crecimiento. Es por esta razón que para que las larvas aseguren su supervivencia se deberán seleccionar presas de tamaño adecuado y de movimiento lento (Civera-Cerecedo *et al.* 2004), además una vez ingeridas las presas sean fáciles de digerir y que cubran los requerimientos nutricionales mínimos de las larvas.

La mayoría de las larvas de peces marinos son predadores planctónicos sin importar los hábitos alimenticios de la especie al ser adultos (Hunter 1981). Desde el punto de vista de la alimentación, las larvas de menor talla requieren alimento vivo por un periodo de 3 a 5 semanas después de la eclosión (en algunos casos pueden llegar a más de 8 semanas). Para algunas especies de talla pequeña, esta desventaja puede ser compensada modificando otros factores como, el tamaño de la boca, tipo de dentición, o que las larvas se desarrollen en un ambiente con gran abundancia y diversidad de presas (Civera-Cerecedo *et al.* 2004). A excepción de algunas larvas de peces dulce acuícolas, la mayoría de larvas tienen la capacidad de capturar y digerir presas zooplanctónicas; para algunos peces los copépodos, son quizás las presas principales, además las que presentan mayor calidad nutricional (May 1974). Sin embargo en la industria acuícola para el desarrollo de cultivos larvales de peces marinos, el número de presas se ha reducido a unas pocas con las cuales se trata de cubrir los requerimientos nutricionales las larvas.

Para desarrollar los cultivos de presas vivas también es necesario contar con cultivos de apoyo que nos permitan alimentar las presas que posteriormente serán

proporcionadas a las larvas; de éstos destaca el uso de microalgas que además son utilizadas para controlar la calidad del agua en los cultivos larvales; entre las especies más utilizadas podemos mencionar: *Tetraselmis sp.*, *Chlorella vulgaris*, *Isochrysis galvana*, *Monochrysis lutheri*, *Nannochlorosis oculata*. Ya que éstas tienen potencial para formar cultivos con abundante biomasa, tamaño celular, digestibilidad y valor nutricional apropiado (Muller-Feuga 2000). Una vez establecidos los cultivos de microalgas estos son utilizados a su vez para la alimentación de las presas vivas utilizadas para alimentar a las larvas en los cultivos. Las principales presas utilizadas son:

1. Los rotíferos (*Brachionus plicatilis*) (50-250 μm) generalmente son utilizados como primer alimento para las larvas de peces marinos (Fukucho 1989); ya que las larvas pueden tener el tamaño de la boca de 100-400 μm siendo esta limitante física la que les impide capturar presas de mayor tamaño. Los rotíferos se cultivan utilizando microalgas o levaduras del mismo tipo que las que utiliza la industria de la panadería y se realiza su enriquecimiento a base de emulsiones lipídicas comerciales, asegurando un alto contenido de ácidos grasos poliinsaturados de la serie omega-3 ya que los rotíferos en sí presentan un deficiente perfil nutricional para las larvas (Léger *et al.* 1989). Actualmente el cultivo de los mismos se ha optimizado logrando incluso densidades de 3,500 rotíferos por mililitro, utilizando sistemas de recirculación y probióticos de apoyo en los cultivos (Dhert *et al.* 2001; Rombaut *et al.* 2003). Las densidades manejadas en los cultivos generalmente van de los 5-20 rotíferos por mililitro (Figura 7-B).
2. Crustáceos (*Artemia sp.*) (200-500 μm) estos organismos son generalmente el segundo tipo de presas que se suministran a las larvas de peces marinos en los

cultivos larvarios, desarrollados en laboratorios; además es usado en la co-alimentación a base de una dieta inerte. No son necesario cultivos de apoyo para la primera fase en el desarrollo de la artemia, ya que esta se suministra recién eclosionada, pues de esta forma presenta un mejor perfil nutricional para las larvas siendo rica en ácido eicosapentanóico (EPA, 20:5(n-3)) y el ácido docosahexaenoico (DHA, 22:6(n-3)) que son esenciales para el buen desarrollo de las larvas, además contiene un buen perfil de aminoácidos, en estadios posteriores la artemia deberá ser enriquecida para poder suplir las demandas nutricionales de las larvas (Schauer y Simpson 1985). Además la artemia presenta la ventaja de permanecer enquistada por mucho tiempo pudiendo de esta forma ser almacenada; en algunos casos es necesario proporcionar estos organismos en estadios mas desarrollados a las larvas, lo que puede acarrear complicaciones, por la fragilidad de los mismos como metanauplios (Sorgeloos *et al.* 2001). Las densidades que se manejan generalmente en los cultivos larvario son de 0.5-3 nauplios de artemia por mililitro (Figura 7-A).

3. Copépodos (*Acartia clausi* y *Pseudodiaptomus hessei*: 50-740 μm): son el alimento natural de la mayoría de las larvas de peces y comprenden un gran numero de especies. De estas especies, las utilizadas en la actualidad son los copépodos calanoideos, y algunos arpacoideos (*Tigriopus japonicus*, *Tisbe furcata*, *Acartia* sp. y *Euterpina acutifrons*) los cuales se han utilizado en acuicultura (Støttrup y Nosker 1997; Nanton y Castell 1998; Shipp *et al.* 2001). Estos organismos presentan ciertas ventajas en su utilización como alimento para las larvas de peces marinos, entre ellas cabe destacar que los copépodos poseen un mejor perfil nutricional con

respecto a los rotíferos y la artemia por esta razón no necesitan ser enriquecidos. Además presentan un menor tamaño que los rotíferos y artemia en sus primeros estadios, haciendo más fácil su ingestión por las larvas en los primeros días de vida. Sin embargo, presentan limitaciones, ya que estos organismos presentan ciclos de vida largos, comparados con otros tipos de alimentos vivos y se tiene que tener cuidado con la especie de copépodo seleccionado ya que una selección errónea puede llevar a disminuir las posibilidades de captura de parte de la larva. En los cultivos larvales las densidades de rotíferos que se manejan son generalmente de 1-10 copéodos por mililitro (Figura 7-C).

4. Larvas trocóforas de bivalvos (40-50 μm): son un alimento apropiado para las larvas de peces marinos, ya que no presentan ningún problema para la ingestión por el tamaño reducido de las mismas. Son varios trabajos donde se han utilizado este tipo de presas en como primer alimento (Lin *et al.* 1986; Kitajima *et al.* 1991; Gracia-López *et al.* 2005). Estos organismos presentan el inconveniente de ser un estadio de corta duración en el desarrollo larval de los bivalvos que no suele durar más de 24 horas, dependiendo de la temperatura del medio y posteriormente se transformaran en larva D que posee concha y que podría causar mortalidad en las larvas en los primeros días de vida (Fig. 7-D).

1.6.3 La captura del alimento

Todos los alimentos utilizados en la larvicultura de peces marinos deben de cumplir una serie de requisitos mínimos para poder asegurar la supervivencia y el crecimiento de las larvas. Las características más importantes que los alimentos deben cubrir son:

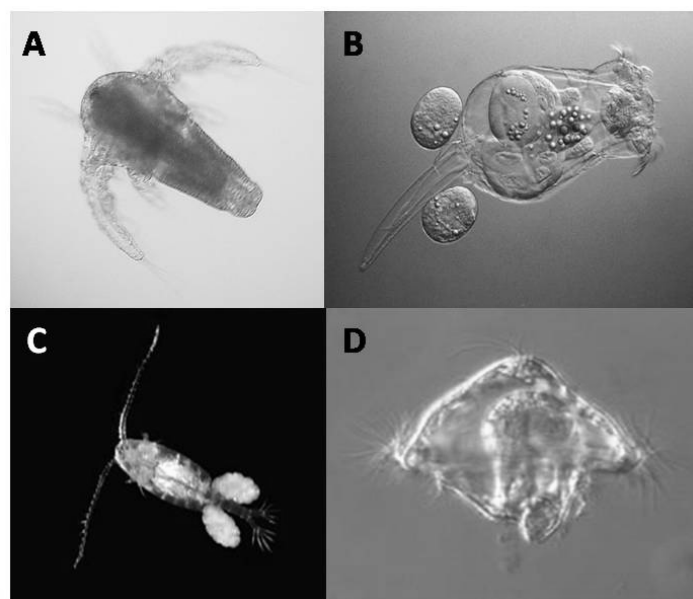


Fig. 7 Principales tipos de alimento vivo utilizado en larvicultura de peces marinos (A- nauplios de artemia, B-rotíferos, C-Copéodos, D-larvas trocoforas de bivalvos).

1. Disponibilidad: en el caso del alimento vivo las larvas deben localizarse en el sitio adecuado para encontrar la suficiente cantidad de presas. Por otra parte, en el caso de los rotíferos y artemia, estos poseen fototropismo positivo y se acumulan en los sitios con mayor iluminación y por esta razón su distribución no es uniforme en los tanques de larvicultura; para evitar este problema se recomienda que la iluminación sea uniforme; así también, la coloración de las paredes de los tanques puede afectar la distribución de las presas en los tanques (Papoutsoglou *et al.* 2000).
2. Densidad: la densidad de presas utilizadas en el cultivo larvario de peces marinos puede variar de 0.5 copéodos/mL (Houde y Schekter 1980) a 200 dinoflagelados/mL (Hunter 1980, 1984), las densidades usuales fluctúan entre 100 dinoflagelados/mL; 5-20 rotíferos/mL; 1-10 nauplios de copéodos/mL; 0.3-5 copéodos adultos/mL; 0.5-6 nauplios de artemia/mL. Aunque esto puede variar

dependiendo de la especie, por lo que estas densidades deben ser cuidadosamente estudiadas y controladas ya que si son excedidas, la calidad del agua se deteriora muy rápidamente, y por el contrario si son muy bajas no habrán suficientes presas para alimentar a todas las larvas, en ambos casos esto se reflejará en un incremento en la dispersión de tallas, propiciando el canibalismo disminución de la supervivencia y del crecimiento de las larvas en el cultivo (Cunha y Planas 1999). El cálculo de la densidad de presas es en su mayor parte teórico, ya que las presas suelen agruparse en diferentes regiones del tanque, lo que reduce la densidad en algunos sitios del tanque y las incrementa en otras. Cuando la densidad de larvas es baja, esto puede tener un efecto adverso en ellas, pues al exceder la cantidad de alimento, puede existir una sobrealimentación la cual provocará problemas en la eficiencia de la digestión, especialmente antes de la transformación, lo que generará altas mortalidades en larvas aparentemente sanas y con alimento en el tracto digestivo (Glasser y Oswald 2001). La densidad de presas es un factor muy importante especialmente en las larvas con menor capacidad de natación y puede variar dependiendo la especie de pez cultivada; Gulbrandsen (1991) ha reportado concentraciones óptimas de 12 rotíferos/mL para las larvas de *Hippoglossus hippoglossus*; para larvas de *Scophthalmus maximus* se reportan densidades óptimas de 1 rotífero/mL (Hagen 1993); Las larvas de *Sparus aurata* de 15 días de vida requieren menos de 5 rotíferos/mL (Ounais-Guchemann 1989); Las larvas de *Coryphaena hippuruss* alcanzan mejores supervivencias al ser alimentadas a densidades de 5 a 20 rotíferos/mL (Ostrowki 1989).

3. Apariencia: muchas larvas de peces marinos no tienen desarrollado el sentido de la vista en sus primeros días de vida, aunque tengan buena movilidad. Las larvas pueden realizar su primera alimentación entre el primer y séptimo día después de la eclosión (Blaxter 1986). Los sentidos del gusto y el olfato se desarrollan pronto, entre la eclosión y los 16 días de vida (Iwai 1980). El color de los tanques tiene un papel importante en este punto, y por ejemplo, los tanques con paredes negras y fondos claros incrementan la capacidad de visión de las larvas y además facilitan al acuicultor la observación de las mismas.
4. Tamaño: el tamaño óptimo para las larvas de peces marinos parece ser adecuada cuando la presa mide aproximadamente el 25% de la apertura de la boca para la primera alimentación y se debe incrementar al 50% conforme los días pasan (Hunter 1984). Shirota (1970) estudió 40 especies de larvas de peces marinos a fin de comparar el ancho de la boca en relación al tamaño de las presas ingeridas, demostró que dependiendo de la especie, que el tamaño de las presas varía dependiendo del tamaño de la boca de las larvas, pero el tamaño de las mismas no debe exceder el 50% del tamaño de la apertura de la boca.
5. Estímulo químico por el alimento: se ha discutido que la presencia de los órganos sensoriales del gusto y el olfato, no están totalmente desarrollados en muchas especies durante los primeros días de vida, por lo que se ha propuesto que el primer estímulo para la alimentación es el movimiento y el tamaño de la presa aunque sin descartar el estímulo químico. Bajo condiciones de cultivo, al utilizar alimentos balanceados (microcápsulas o microparticulado), los estímulos olfatorios y gustativos pueden ser necesarios y hasta esenciales como se ha demostrado en las

larvas de jurel *Seriola dumerili*, donde la adición de aminoácidos libres (prolina, alanina, metionina y monofosfato de inosina) incrementan la supervivencia y el consumo (Masuma *et al.* 1990).

2 Justificación

Uno de los principales factores para la consolidación de una industria acuícola dedicada al cultivo de peces marinos, es la garantía de un abasto de alevines. La optimización de las técnicas de cultivo larvario en peces marinos, requiere un conocimiento profundo sobre la biología y fisiología de las especies de interés tales como:

1. El conocimiento de las etapas del proceso de metamorfosis de los peces.
2. Los cambios morfológicos y funcionales en el sistema digestivo de las larvas.
3. El efecto de los parámetros ambientales fisicoquímicos o biológicos en la supervivencia y crecimiento de las larvas.

El presente trabajo aborda estos tres puntos y aporta los conocimientos generados como herramientas útiles, para mejorar las técnicas de cultivo larvario en la cabrilla sardinera y de esta forma incrementar la supervivencia larvaria en los cultivos y optimizar el uso de las instalaciones.

3 Hipótesis de trabajo

El desarrollo de este trabajo de tesis fue condicionado de acuerdo a las siguientes hipótesis:

1. El conocimiento de la ontogenia morfológica y enzimática durante los periodos embrionario y larvario en la cabrilla sardinera, permitirá mejorar las prácticas de manejo y de esta forma incrementar la supervivencia en los cultivos.
2. El manejo óptimo de los parámetros físicos y biológicos de intensidad de luz, tipo de presa y disponibilidad de alimento, pueden incrementar el crecimiento y la supervivencia de las larvas de cabrilla sardinera durante el periodo de su primera alimentación.

4 Objetivos

4.1 Objetivo general

Describir el desarrollo morfológico y la ontogenia digestiva de la cabrilla sardinera a través de técnicas bioquímicas e histológicas. Así mismo, determinar los valores óptimos de intensidad de luz, tipo de presa y disponibilidad de alimento durante la primera alimentación.

4.2 Objetivos específicos

1. Describir la secuencia y definir los estadios de desarrollo larvario en la cabrilla sardinera, relacionando talla, edad y desarrollo estructural.
2. Describir el desarrollo estructural del sistema digestivo y determinar la actividad de las enzimas digestivas: lipasa, amilasa, maltasa, tripsina, fosfatasa alcalina, aminopeptidasa, leucin-alanin peptidasa, pepsina, y quimotripsina involucradas durante la ontogenia inicial de la cabrilla sardinera, alimentadas con presas vivas y alimento balanceado.
3. Determinar el tipo, densidad de presas y la intensidad lumínica óptimos para el mejor crecimiento y supervivencia durante su primera alimentación.

5 Materiales y métodos

5.1 Desarrollo morfológico y modelo de crecimiento

5.1.1 Obtención de huevos, producción de larvas, muestreos y registro fotográfico

Los huevos fertilizados fueron obtenidos de un desove espontáneo de organismos reproductores mantenidos en cautiverio (8♀, 2♂); los huevos fueron colectados en una malla de 300 μm , se contaron volumétricamente y se colocaron en 3 tanques de 300 litros donde la densidad de siembra fue de 25 huevos por litro. La viabilidad de los huevos se confirmó de forma volumétrica (Piper *et al.* 1982) y se verificó mediante análisis microscópico. Previamente el tanque fue llenado con agua de mar a una salinidad de (35 g L^{-1}), filtrada ($\leq 1 \mu\text{m}$) y esterilizada (UV). La temperatura del agua durante el cultivo larval fue de 25 °C, la que se mantuvo utilizando un calentador (RENA de 300 W). El tipo de aireación fue de burbujeo central que permitió mantener la concentración de oxígeno $> 5.5 \text{ mg L}^{-1}$. El fotoperíodo utilizado fue de 24 horas luz con una intensidad de 300 lux. El recambio de agua se realizó a diario a partir de los 3 días posteriores a la eclosión (DPE); con un 20% hasta el 7 DPE; posteriormente se incrementó el recambio a un 50% del 8 DPE al 20 DPE, y finalmente del 21 DPE hasta el 60 DPE, el recambio diario fue de un 100%.

El primer alimento proporcionado a las larvas durante los 3 a los 6 DPE consistió rotíferos de la especie *Brachionus plicatilis* (Müller, 1786) tamizados a 75 μm y sin enriquecer, en una densidad de 10 rotíferos mL^{-1} , del día 7 a los 30 DPE se proporcionaron rotíferos enriquecidos utilizando el producto comercial SALT CREEK HUFA ENRICH. Del día 16 a los 35 DPE se suministraron nauplios de *Artemia franciscana* Kellogg, 1906 en una densidad de 1 a 2 nauplios mL^{-1} . El destete de las larvas se realizó a partir del día 31

DPE, utilizando el alimento micro-particulado (Caviar, Bernaqua, Olen, Bélgica) con un tamaño de partícula de 200-300 μm .

La limpieza del sistema se realizó por medio de un sifón una vez al día. Los parámetros físico-químicos se monitorearon diariamente por medio de los siguientes instrumentos: temperatura y oxígeno disuelto por un sensor YSI modelo 55, salinidad con un refractómetro EXTECH INSTRUMENTS modelo RF 20 y la intensidad de la luz en la superficie del agua con un fotómetro EXTECH.

Los muestreos se realizaron al azar tomando 10 individuos por muestreo los días: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 10, 15, 20 y posteriormente los días 25, 30, 35, 40, 45, 55 y 60 se tomaron 5 individuos. Las muestras fueron observadas a partir del día 1 hasta el día 10 por medio de un microscopio óptico (OLYMPUS BX41), a partir del día 15 hasta el día 25 se observaron por medio de un estereoscopio (LEICA MZ75), tomando fotografías con una cámara digital (COOLSNAP-PRO) utilizando el programa Image-Pro Plus 4.5 MEDIA CYBERNETICS. Del día 30 hasta el día 60 las larvas se fotografiaron con una cámara digital (NIKON D100) con una lente 24-85mm. Se describieron 8 estadios de desarrollo de acuerdo a los trabajos de Kendall *et al.* (1984); Kitajima *et al.* (1991); Heemstra y Randall (1993).

5.1.2 Evaluación morfométrica

Se tomaron las siguientes medidas: longitud total (L_t); la medida de la boca (S_m); la altura de la cabeza, considerando el opérculo (H_h); la longitud de la cabeza que se determinó como la distancia de la punta anterior de la cabeza al opérculo (L_h); la longitud del tronco se considero como la distancia entre el opérculo y la punta anterior de la aleta anal (L_{tr}); la altura de la cola es la distancia entre la base anterior de la aleta anal y la base

de la aleta dorsal (H_t); la longitud de la cola es la distancia entre el ano y la punta del notocordio (L_{ta}); el diámetro del ojo (E_d) (Fig. 8) y se calculó el % de la longitud de las espinas dorsales y pélvicas con relación a la longitud total. Las medidas se tomaron de forma perpendicular u horizontal al eje del cuerpo. Se excluyen de este estudio organismos con anomalías.

5.1.3 Análisis estadístico

El crecimiento de las larvas en función del tiempo se calculó mediante una ecuación lineal de L_t donde $y = mx+b$; donde $m = a$ la pendiente de la recta, $b = a$ la ordenada al origen y $x =$ al punto en el plano cartesiano. Así mismo el incremento del tamaño de la boca en relación con la longitud total se calculó utilizando el mismo tipo de ecuación. El crecimiento alométrico fue calculado usando una función de L_t donde $y = a L_t^b$ (Fuiman 1983), donde el intercepto y el exponente se obtienen de una regresión lineal de los datos no transformados ya que con estos se obtuvo un mejor ajuste. Cuando el crecimiento es isométrico, el coeficiente $b = 1$, cuando es positivo $b > 1$ y cuando es negativo $b < 1$. Los puntos de inflexión se determinaron mediante una prueba t (media \pm E.S.), en donde la diferencia entre los valores de crecimiento fuera significativa.

5.2 Ontogenia digestiva

5.2.1 Producción de larvas y análisis enzimático

Para la producción de larvas se utilizó la misma metodología empleada en el experimento de desarrollo morfológico, ya que los dos experimentos se desarrollaron de forma simultánea.

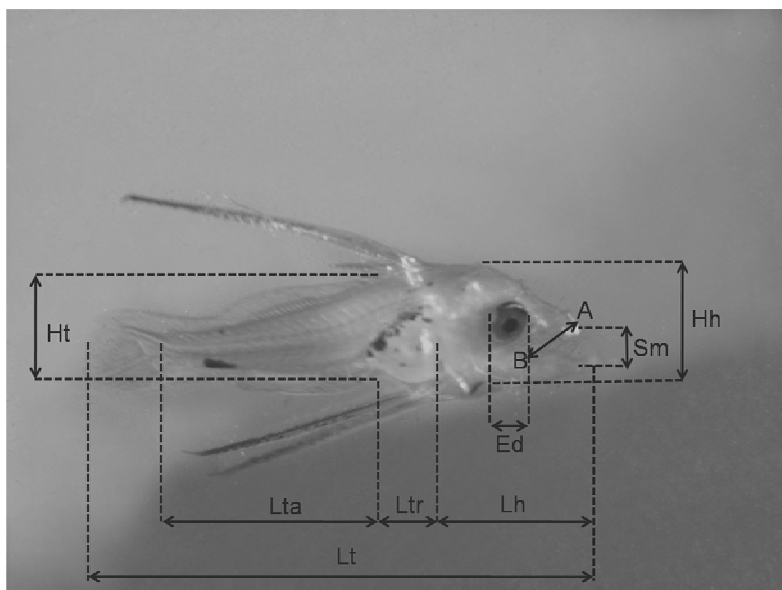


Fig. 8 Medidas de los caracteres morfométricos en la cabrilla sardinera (*Myxeroperca rosacea*). Lt= longitud total; Hh = altura de la cabeza; Lh = longitud de la cabeza; Ltr = longitud del tronco; Ht = altura de la cola; Lta = longitud de la cola; Ed = diámetro de los ojos; Sm = tamaño de la boca = $(\sqrt{2}) \times (AB)$

Se tomaron como muestra para el análisis enzimático un mínimo de 500 mg en peso húmedo de las larvas colectadas por triplicado, esto es de 2400 a 3 larvas por muestra dependiendo del peso de las mismas en sus diferentes etapas de crecimiento (Fig. 9). Para este propósito, se utilizó una balanza digital OHAUS Adventure (New Jersey USA).

Los muestreos de los cultivos larvales mantenidos en ayuno se realizaron diariamente a partir del 1 DPE hasta el 7 DPE, ya que la mortalidad del cultivo larvario llega al 100% a los 8 días de ayuno a 25°C que fue la temperatura en la que se desarrolló el experimento. Los muestreos de los cultivos larvales a los que se les proporcionaron alimento se realizaron diariamente a partir del 1 DPE hasta el 7 DPE y posteriormente se realizaron muestreos los días 10, 15, 20, 25, 30, 35 y 40.

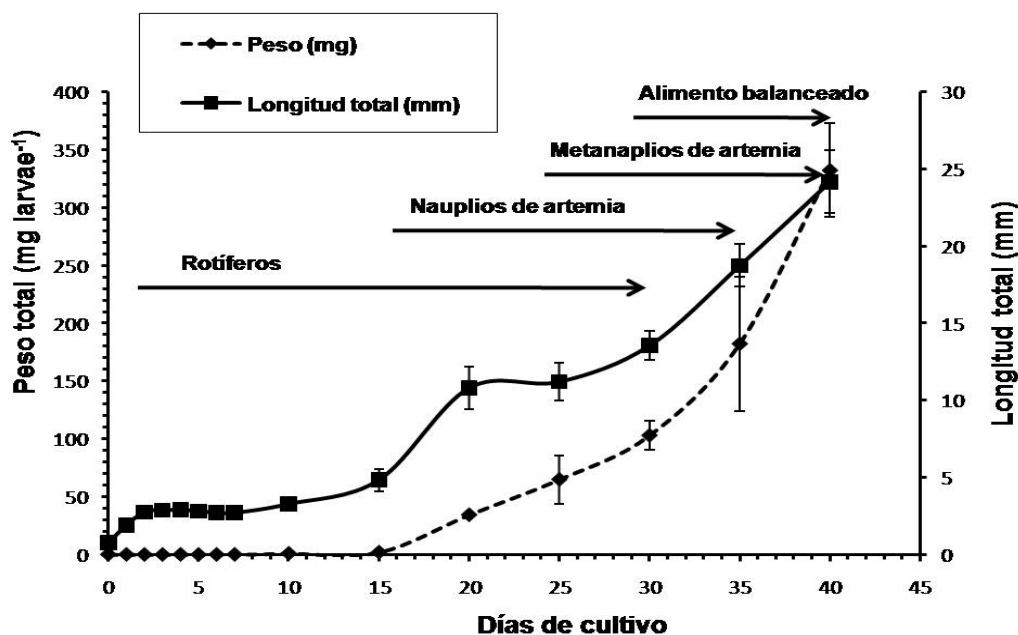


Fig. 9 Peso húmedo, longitud total de las larvas de cabrilla sardinerita (media \pm DS, n = 10) y alimento proporcionado durante su desarrollo larvario

También se evaluaron muestras de huevos, de los que se tomaron aproximadamente 1000 en estadio de embrión para verificar si alguna de las enzimas cuantificadas en este estudio mostraba alguna actividad previa al momento de la eclosión. Posteriormente, las muestras se congelaron a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ en un ultra-congelador hasta el momento de su análisis. Adicionalmente, se tomaron 10 individuos de muestra para hacer histología de las larvas en cada uno de los tiempos evaluados y contrastar los resultados obtenidos mediante análisis bioquímicos. La técnica utilizada para el análisis de histología fue hematoxilina-eosina (Humason 1997); posteriormente los cortes fueron observados por medio de un microscopio óptico (OLYMPUS BX41) tomando fotografías con una cámara digital (COOLSNAP-PRO) en un aumento de entre 4 y 40 veces y analizándolas utilizando el programa Image-Pro Plus versión 4.5 de MEDIA CYBERNETICS.

5.2.2 Análisis bioquímico

Las muestras tomadas para el análisis enzimático de las larvas fueron procesadas en un homogenizador marca Pro Scientific inc. Modelo Pro-200 en buffer frío Tris-HCl a 50 mM, pH 7.5 (25 mg mL⁻¹). El sobrenadante se obtuvo después de centrifugar los homogenizados a 12,000 g por 12 minutos a 5 °C; posteriormente, se congelaron las muestras a -20 °C para su análisis enzimático. La concentración de proteína soluble se determinó utilizando el método descrito por Bradford (1976) usando albúmina sérica bovina como estándar. La actividad de la proteasa ácida fue evaluada por el método descrito por (Anson 1938), usando 0.5% de hemoglobina como sustrato en 0.1 mM en buffer de glicina/HCl, pH 2.0. La mezcla fue incubada a 37 °C y la reacción se detuvo agregando 0.5 mL de TCA (ácido tri-cloro acético) al 20 %. La unidad de proteasa ácida se determinó como 1 µg de tirosina liberada por minuto usando un coeficiente de extinción molar de 4.171 calculado a partir de una recta patrón con diferentes concentraciones de tirosina (de 0 a 300 µg/mL).

La actividad de tripsina se determinó a 25 °C en un buffer de 50mM Tris-HCl a pH 8.2 conteniendo 10 mM CaCl₂ acorde al método descrito por Erlanger *et al.* (1961), utilizando BAPNA a una concentración 100 mM (N- α -benzoil-DL-arginina p-nitroanilida) como sustrato (en 10 mM DMSO). La actividad de la quimotripsina se determinó de acuerdo al método descrito por Ásgeirsson y Bjarnson (1991), utilizando BTEE a una concentración de 5 mM (benzoil tyrosina metil éster) como sustrato (5 mM en DMSO) y utilizando un buffer Tris 44.4 mM conteniendo 55.5 mM CaCl₂ a un pH 7.8. La actividad de la fosfatasa alcalina se determinó de acuerdo con el método descrito por Bessey (1946), utilizando como sustrato 4-nitrofenilfosfato al 2% utilizando un buffer de NaCO₃ a una

concentración 30 mM pH 9.8; el coeficiente de extinción molar del sustrato utilizado fue de 0.0183.

La actividad de la aminopeptidasa N se determinó de acuerdo con el método descrito por Maraux (1973), utilizando como sustrato L-Leucina p-nitroanilida 0.1M en DMSO y el Buffer de fosfatos, 80mM, pH=7. Una unidad de actividad de la enzima se define como 1 μ g de nitroanilida liberada por minuto usando un coeficiente de extinción molar de 0.0082. La actividad de las enzimas citosólicas o intracelulares (Leucina alanina peptidasa) se determinó de acuerdo con el método descrito por Nicholson J.A. and Kim Y.S. (1975); utilizando como sustratos Leu-ala (0.010 M) (2 mg/mL) y el Buffer de Tris-HCl 50 mM, pH=8; la reacción se detiene utilizando H₂SO₄.

La actividad de la amilasa se determinó de acuerdo con el método descrito por Vega-Villasante *et al.* (1993) utilizando como sustrato almidón soluble (1%) en buffer Tris-HCl 50 mM pH 7.5, como revelador de la reacción se utiliza carbonato de Sodio (2N) y el reactivo DNS (ácido dinitrosalicílico). La actividad de la maltasa se determinó de acuerdo con el método descrito por Dahlqvist (1984); utilizando buffer Tris-HCl 500 mM a pH=7 y como sustrato maltosa 56 mM en agua. La actividad de la lipasa se determinó de acuerdo con el método descrito por Versaw *et al.* (1989) utilizando como sustrato β -Naphthyl-Caprylate (200 mM) y taurocolato de Sodio (100 mM); el buffer utilizado Tris-HCl (50 mM, pH 7.2); la reacción se detiene con TCA (ácido tri-cloro acético) (0.72 N).

La actividad específica de los extractos se determinó utilizando las siguientes ecuaciones: (1) unidades por mL = $(\Delta \text{ abs}) \times \text{volumen final de la reacción (mL)} / (\text{CEM} \times \text{tiempo (min)} \times \text{volumen del extracto (mL)})$. (2) unidades por mg de proteína = $(\text{unidades/mL}) / (\text{mg proteína soluble/mL})$. Δ abs representa el incremento de absorbancia a

una determina longitud de onda y el CEM representa el coeficiente de extinción molar por el producto de la reacción ($\text{mL } \mu\text{g}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). (3) Actividad de unidades por larva = $(\text{unidades/mL})/\text{n}^\circ$ de larvas/mL. Todos los análisis se realizaron por triplicado.

5.2.3 Análisis estadístico

Se utilizó la prueba U de Mann-Whitney para comparar la actividad enzimática de las larvas en ayuno y las larvas alimentadas hasta los 7 DPE. Dado que la distribución de los datos obtenidos no se ajusta a los criterios de normalidad, se usó la prueba de Kruskal-Wallis ($P < 0.05$) para comparar la actividad enzimática entre los distintos días en los que se realizaron los muestreos.

5.3 Análisis del tipo y densidad de presas é intensidad de luz óptimos durante la primera alimentación

Para evaluar estos tres parámetros se realizaron tres experimentos que compartieron un procedimiento básico en común, el material biológico se obtuvo utilizando la misma metodología explicada en el experimento de desarrollo morfológico (apartado 5.1.1). Con las variantes que en el desarrollo de estos experimentos se utilizó un sistema de 16 tanques de 100 litros de volumen útil, la temperatura del agua se mantuvo durante todo el cultivo larvario a 26 ± 1 °C y además se adicionó 5 litros de micro alga *Nannochloropsis oculata* diluida a una densidad de 5, 000,000 células/mL al cultivo dos veces al día por tanto el recambio diario de los tanques fue del 10% en todos los experimentos.

Se realizaron muestreos los días 4, 6 y 8, se evaluó la densidad de larvas por medio de muestreos realizados con un vaso de precipitado de 1 litro en los días 4 y 6, se contó el número de larvas en un litro y se extrapoló al volumen total para tener un estimado del número de larvas totales en el tanque. Se tomaron 10 larvas y se fotografiaron en fresco y

se evaluó el crecimiento en los tres experimentos, utilizando un microscopio óptico (OLYMPUS BX41) tomando fotografías de la larva completa a un aumento de 4 veces y midiendo la longitud del notocordio como referencia de crecimiento, para esto se uso una cámara digital (COOLSNAP-PRO) utilizando el programa Image-Pro Plus versión 4.5 de MEDIA CYBERNETICS. El día 8 se contó el número total de larvas en el tanque mediante el tamizado del volumen total de agua. Todos los muestreos se hicieron por triplicado.

5.3.1 Análisis estadístico

Dado que la distribución de los datos obtenidos no se ajustó a los criterios de normalidad, se uso la prueba de Kruskal-Wallis ($P < 0.05$) para comparar la supervivencia y el crecimiento entre los distintos tratamientos en los todos los experimentos.

5.3.2 Evaluación del tipo de presa

Para el desarrollo de este experimento se evaluaron 3 tipos de alimentos: rotífero tamizado a 75 μm , trocóforas de ostión japonés (*Crassostrea gigas*) y la mezcla de ambos alimentos. Además se evaluó un testigo con larvas en ayuno. La intensidad de luz durante el desarrollo de todo el experimento fue de 500 lux. Todos los valores se evaluaron por triplicado.

La densidad de siembra fue de 100 huevos viables por litro esto se determino por medio de técnicas volumétricas (Piper *et al.* 1982), para evaluar el % de eclosión se sembraron 100 huevos en una plantilla múltipozos de 2 mL de volumen a temperatura ambiente, en cada pozo y se colocó un huevo y se evaluó la eclosión 24 horas después, como resultado se obtuvo una eclosión 55.7 %.

El alimento fue proporcionado a las larvas a partir del tercer día posterior a la eclosión ya que en este momento se da la apertura de la boca de la cabrilla sardinera en

cultivos realizados a esta temperatura. La densidad de presas fue de (5 trocóforas/ mL) dos veces al día cada 12 horas, (3 rotíferos/ mL) tres veces al día cada 6 horas y la mezcla de ambos proporcionados dos veces al día cada 12 horas (5 rotíferos y 5 trocóforas/mL); se verificaba el alimento residual dos veces al por la mañana y por la tarde antes de la alimentación y el recambio de agua, se ajustaban las cantidades de alimento a proporcionar para la siguiente alimentación. Las mallas en la salida de agua en los tanques donde se alimentó con rotíferos y la mezcla de alimentos fue de 300 μm para evitar la saturación de presas en el medio; y la malla de salida en los tanques donde se alimentaron las larvas con trocóforas fue de 50 μm .

5.3.3 Evaluación de la densidad de presas

Para evaluar las la viabilidad y % de eclosión de las larvas del desove utilizado para este experimento se utilizó la metodología descrita en el experimento de evaluación de tipo de presa (apartado 5.3.2). La densidad de siembra fue de 50 huevos por litro, el porcentaje y se obtuvo una eclosión del 60.06 %.

Para el desarrollo de este experimento, se proporciono el alimento a las larvas a partir del tercer día posterior a la eclosión, el único tipo de alimento que se utilizó durante todo el experimento fue trocóforas de ostión japonés (*Crassostrea gigas*). Se evaluaron las densidades de: 2, 10, 18 y 26 trocóforas/ mL. El alimento se proporcionó en dos raciones, una ración cada 12 horas. La intensidad de luz que se manejó en el desarrollo de este experimento fue de 500 lux, todos los valores se evaluaron por triplicado.

Dado que el amonio es el principal producto de excreción de los teleósteos, incluyendo sus larvas y también es el producto de excreción de los organismos que se utilizan como alimento para las larvas y de las bacterias que se alimentan

heterotróficamente (Brownell 1980) y también los nitritos que son metabolitos tóxicos (Tucker 1998) y dado que las densidades de alimento que se manejaron en este experimento fueron altas; adicionalmente en este experimento se evaluó el contenido de nitritos (NO_2) por medio del procedimiento para la determinación de nitrógeno de nitritos disueltos en agua, basado en el método de Bendschneider y Robinsón (1952); y el contenido de amonio (NH_4) por medio del procedimiento para la determinación de nitrógeno de amonio disuelto en agua de Solórzano (1969). Estos análisis se realizaron bajo el supuesto que la presencia de estos metabolitos en altas concentraciones puede afectar la supervivencia de las larvas en este experimento. El experimento duro 8 días.

5.3.4 Evaluación del efecto de la intensidad de la luz en la primera alimentación

En el desarrollo de este experimento se aplicaron los conocimientos adquiridos en los experimentos de tipo de presa y densidad de alimento. Se evaluó la viabilidad y el % de eclosión de las larvas del desove, utilizando la metodología descrita en los dos experimentos previos; la densidad de siembra fue de 100 huevos por litro y se obtuvo una de eclosión del 55.44%.

Se proporciono como alimento larvas trocóforas de *C. gigas* a las larvas de cabrilla sardinera a partir del tercer día posterior a la eclosión a una densidad de 20 presas por mililitro divididas en dos raciones diarias una cada 12 horas. Se evaluaron las siguientes intensidades de luz: 0 lux, 100 lux, 500 lux, 1000 lux y un testigo con larvas en ayuno con la luz del medio ambiente natural en el laboratorio, 100 ± 50 lux. Todos los valores se evaluaron por triplicado. El fotoperíodo utilizado fue 24 horas luz a cada una de las intensidades respectivas a evaluar. El experimento duro 8 días.

6 Resultados

6.1 Desarrollo morfológico y modelo de crecimiento

6.1.1 Desarrollo morfológico

La eclosión de las primeras larvas ocurrió 24 horas después de la siembra, el 100% de los huevos había eclosionado 30 horas después. El desarrollo morfológico de las larvas de cabrilla sardinera se describe a continuación:

Estadio 1 (día 1) $L_t 1.96 \pm 0.23$ mm (media \pm D.E.): se observó ausencia de pigmentación, la actividad motora es débil con movimientos espasmódicos cortos. En este estadio no se observan aletas y la larva utiliza para su locomoción los primordios de los pliegues que rodean el notocordio. El saco de vitelo mide 0.96 ± 0.23 mm el cual comienza ligeramente hacia atrás del extremo anterior de la cabeza y se extiende hasta casi la parte media del organismo en la región ventral. Las larvas presentan una sola gota de aceite con un diámetro de 0.18 ± 0.01 mm, que se ubica en la región posterior del saco de vitelo. La boca no está formada y el tracto digestivo está poco desarrollado, se observan los primordios ópticos (Fig. 10, estadio 1).

Estadio 2 (días 2 y 3) $L_t 2.91 \pm 0.07$ mm: se observó la apertura de la boca en el 15 % de las larvas ($n = 20$). Comienza la pigmentación de los ojos y la formación del lente ocular. Se observa el tubo digestivo paralelo al notocordio. Aparecen melanóforos en la región ventral y en dos puntos a ambos lados del notocordio en la región posterior media del organismo. Los primordios de las aletas pectorales son visibles, pero los radios son ausentes y se forman las cápsulas óticas. El cuerpo se estrecha en los pliegues de la región posterior que presentan mayor desarrollo, el saco de vitelo presenta un diámetro de (0.19 ± 0.02 mm) y la gota de aceite (0.06 ± 0.01 mm). Se observa una hendidura donde estará el

opérculo. Además se observan 4 pequeñas extensiones con forma de espinas en la cabeza, dos en la parte frontal y una a cada lado de la cabeza (Fig. 10, estadio 2).

Estadio 3 (días 4 al 10) $L_t 3.31 \pm 0.37$ mm: se observa claramente la retina, los ojos que están bien pigmentados y los orificios nasales son visibles. Los melanóforos son abundantes en la zona ventral y parte media de la región caudal específicamente en el notocordio. La boca ya funcional pasa de una posición sub-terminal a terminal; se observan movimientos peristálticos en el tubo digestivo y se distingue alimento en la parte media del mismo. Se observa irrigación sanguínea en la región cefálica donde se distingue la médula partiendo del sistema nervioso cefálico. Son visibles los arcos branquiales. El pliegue en la región caudal se hace mas estrecho y comienza la formación de los radios en las aletas pélvicas, dorsal y caudal, comienza la formación de las espinas extendidas en las aletas pélvicas y dorsal características de esta familia de peces (segunda espina de la aleta dorsal y primera espina de las pélvicas). En este periodo, se infla la vejiga natatoria. Las larvas reaccionan a estímulos externos. En este estadio se agota el saco de vitelo y las pequeñas extensiones en forma de espinas de la cabeza desaparecen (Fig. 10, estadio 3).

Estadio 4 (días 15 al 20) $L_t 10.84 \pm 1.39$ mm: se desarrolla la segunda espina de la aleta dorsal y la primera espina en cada una de las aletas pélvicas. Estas espinas se pigmentan en el último tercio de su longitud y tienen los bordes aserrados; también se forman 2 espinas en el preopérculo. El cuerpo aún carece de pigmentación excepto en la región ventral y un punto con abundantes melanóforos en la parte posterior cerca de la aleta caudal. Se definen las masas musculares epaxial e hipaxial en la región caudal. Comienza la flexión del notocordio y se distinguen los radios de la aleta caudal en su parte inferior. En

la cabeza destaca el incremento de tamaño del hueso dentario y la pre-maxila (Fig. 10, estadio 4).

Estadio 5 (Día 25) L_t 13.58 ± 0.94 mm: aparecen los radios blandos de la aleta dorsal y anal, se desarrollan los radios de la aleta caudal, se flexiona el notocordio a 45 grados (Fig. 10, estadio 5).

Estadio 6 (días 30 al 35) L_t 18.76 ± 1.38 mm: se desarrollan totalmente los radios blandos de las aletas pélvicas, caudal ($n = 14$), dorsal ($n = 17$) y anal ($n = 7$). Se forma el urostilo, la placa hipural y se observan los arcos branquiales bien desarrollados. Se registró una reducción del tamaño de las 3 largas espinas que caracterizan las larvas de esta sub familia de Serranidos. El cuerpo del organismo aún carece de pigmentación (Fig. 10, estadio 6).

Estadio 7 (días 40 al 55) L_t 24.70 ± 1.75 mm: el cuerpo comienza a recubrirse de escamas, comienza la pigmentación en la región posterior de las larvas y aparece la línea lateral. Las espinas largas de las aletas pélvicas y dorsal continúan reduciendo su tamaño (Fig. 10, estadio 7).

Estadio 8 (día 60) L_t 30.64 ± 0.23 mm: los organismos terminan su etapa larval, el cuerpo del 100% de los organismos muestreados ($n = 5$) está totalmente cubierto de escamas y presentan las características morfológicas propias de esta especie. La tasa de supervivencia al final del experimento fue de 1.10 ± 0.22 % (Fig. 10, estadio 8).

6.1.2 Crecimiento

Las larvas presentaron una longitud total (L_t) al inicio del cultivo larvario de 1.95 mm ± 0.22 mm y su L_t al completar la metamorfosis fue de 30.64 mm ± 0.23 mm (Fig. 11). En el 3 DPE la medida de la boca (S_m) en las larvas fue de 0.13 mm ± 0.03 mm y a los 60

DPE fue de $6.10 \text{ mm} \pm 0.23 \text{ mm}$ (Fig. 12). No se encontraron diferencias significativa ($p = 0.125$, $n = 39$) entre la longitud de las espinas dorsal y pélvicas que aparecen entre los 10-15 dpe. La longitud máxima de las espinas se alcanza a los 20 DPE pudiendo representar hasta un 81% de la longitud total del cuerpo (Fig. 13, Tabla 2).

6.1.3 Crecimiento alométrico

Durante el desarrollo larvario, la cabrilla sardinera presenta cambios en la proporción de su cuerpo los cuales se describen a continuación. Todas las estructuras anatómicas analizadas presentan un crecimiento alométrico en dos periodos ($P < 0.001$). El primer periodo de crecimiento en las estructuras analizadas es negativo en relación con la longitud total (Lt), en la segunda fase de crecimiento se observa un punto de inflexión positivo de las estructuras analizadas en relación con la longitud total de las larvas.

La altura y longitud de la cabeza (Hh, Lh) presentan un crecimiento alométrico negativo durante el primer periodo de su desarrollo larval hasta los 35 DPE ($b = 0.72 \pm 0.24$, $n = 76$; $b = 0.72 \pm 0.26$, $n = 66$; respectivamente). Posteriormente, durante el segundo periodo de crecimiento, las larvas presentan un crecimiento alométrico positivo a partir de los 35 DPE hasta completar la metamorfosis a los 60 DPE ($b = 4.92 \pm 2.25$, $n = 36$; $b = 5.61 \pm 2.51$, $n = 40$; respectivamente) (Fig.14a, 14b).

La longitud del tronco (Ltr), la altura de la cola (Ht) y la longitud de la cola (Lta) también presentan un primer periodo de crecimiento alométrico negativo en relación con la longitud total similar al presentado por las estructuras de la cabeza hasta los 35 DPE ($b = 0.58 \pm 0.10$, $n = 56$; $b = 0.52 \pm 0.13$, $n = 76$; $b = 1.55 \pm 0.25$, $n = 76$; respectivamente). Durante el segundo periodo, analizado las estructuras presentan un crecimiento alométrico

positivo a partir de los 35 DPE hasta terminar la metamorfosis DPE ($b = 2.52 \pm 1.35$, $n = 42$; $b=3.10 \pm 1.77$, $n = 46$; $b = 5.43 \pm 2.16$, $n = 46$; respectivamente) (Fig. 14c, 14d, 14e).

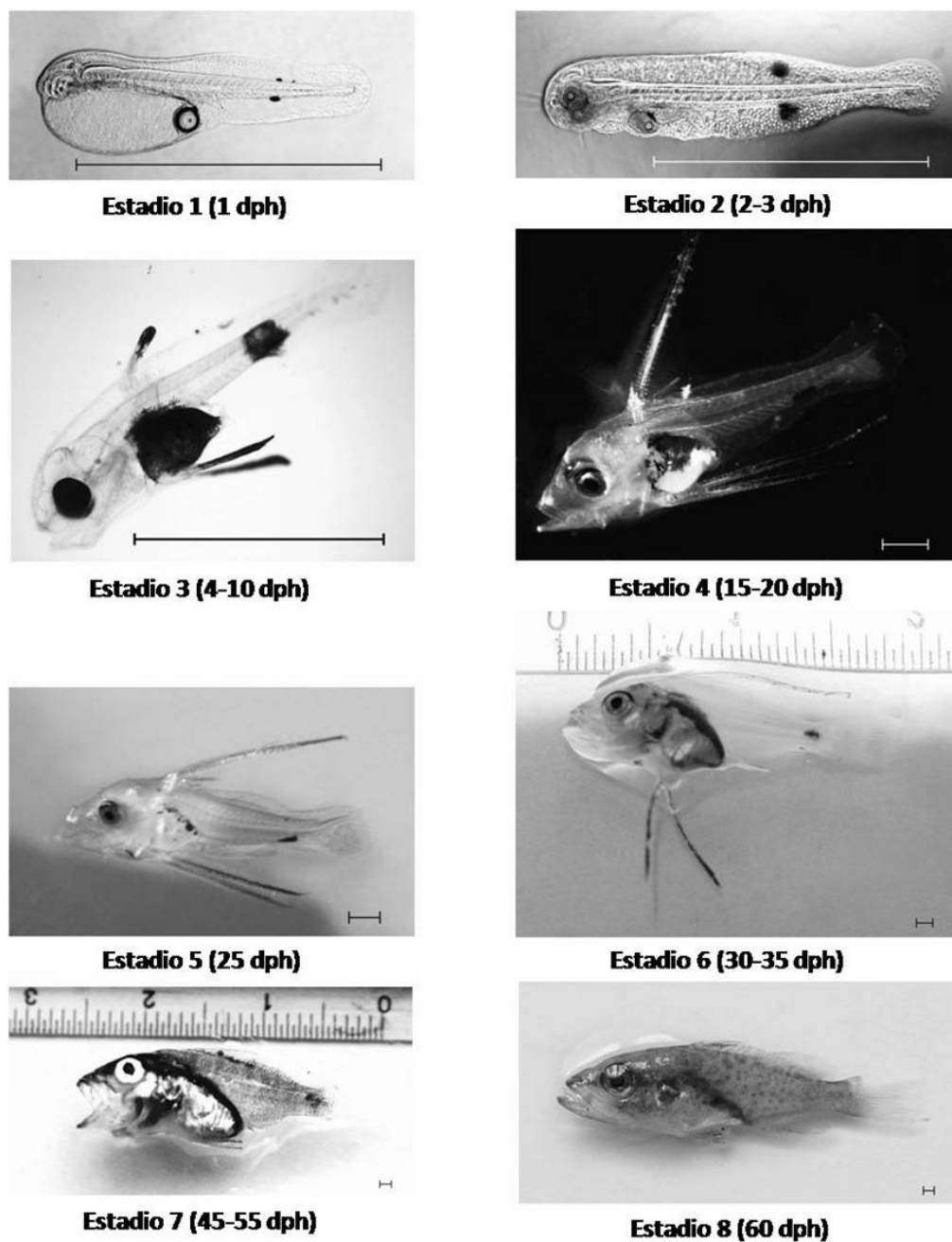


Fig. 10 Desarrollo morfológico de la cabrilla sardinera (*Mycteroperca rosacea*) (dph = días posteriores a la eclosión) la barra = 2 mm.

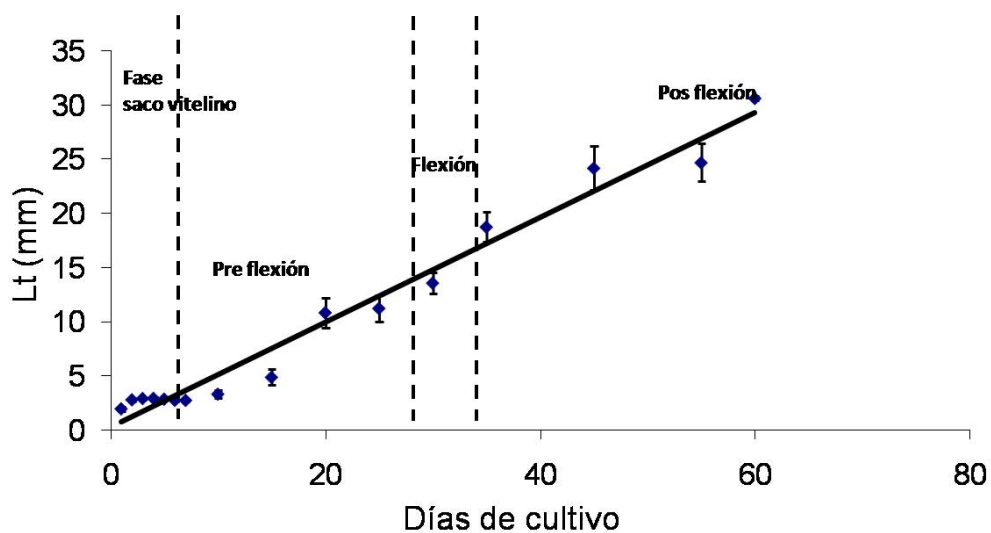


Fig. 11 Días de cultivo en relación con la longitud total (Lt) de la cabrilla sardinera, desde la eclosión hasta la metamorfosis ($y = 0.4839x + 0.2972$; $r^2 = 0.97$; $n = 122$).

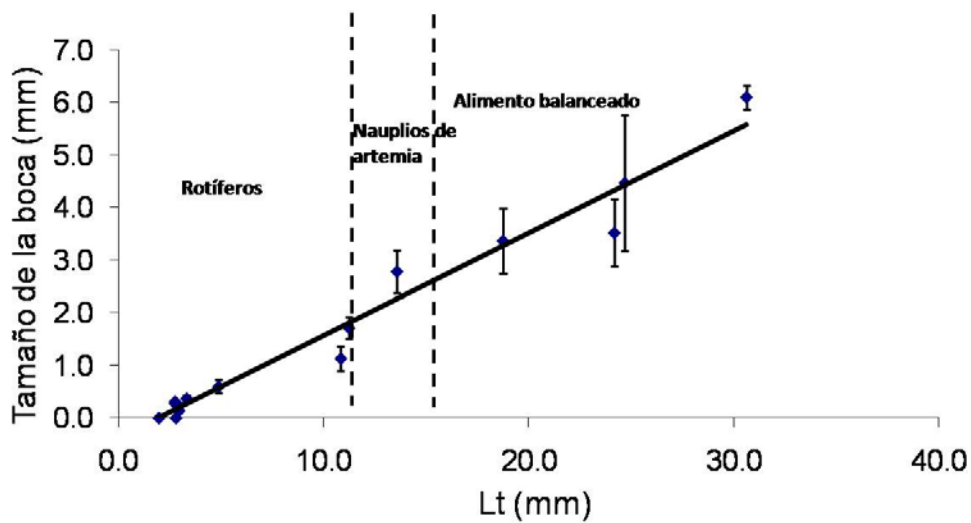


Fig. 12 Tamaño de la boca en relación con la longitud total, durante el desarrollo larvario hasta la metamorfosis ($y = 0.0953x - 0.3511$; $r^2 = 0.96$; $n = 73$).

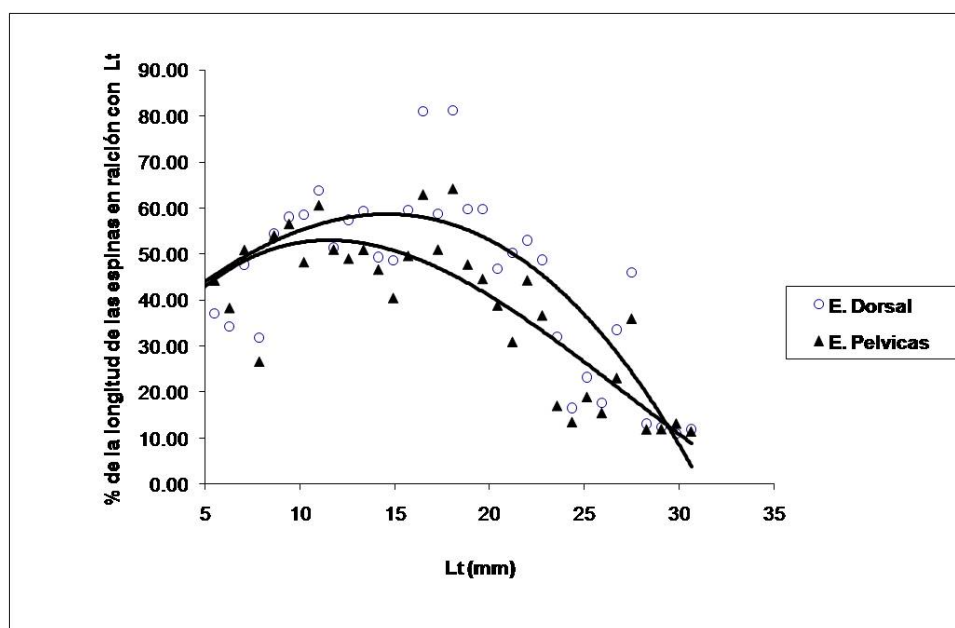


Fig. 13 Porcentaje de la longitud de la segunda espina dorsal y las espinas pélvicas en relación con la longitud total de la cabrilla sardinera durante su desarrollo larvario.

Tabla II Porcentaje de la longitud máxima de la segunda espina dorsal y las espinas pélvicas en relación con la longitud total de las larvas.

Especies	2 nd D.S. ¹ (%)	P.S. ² (%)	Autor
<i>Epinephelus malabaricus</i>	53	49	Leu, Liou & Fang (2005)
<i>Epinephelus septemfasciatus</i>	75	54	Kitajima <i>et al.</i> (1991)
<i>Epinephelus tauvina</i>	48	42	Hussain & Higuchi (1980)
<i>Mycteroperca rosacea</i>	81	64	Presente trabajo

¹Espina dorsal

²Espinas pélvicas

Diámetro de los ojos (Ed) presenta un crecimiento alométrico negativo durante el primer periodo del desarrollo larvario hasta los 40 DPE, ($b = 0.236 \pm 0.086$, $n = 86$).

Durante el segundo periodo de desarrollo larvario, esta estructura presenta un crecimiento alométrico positivo hasta los 60 DPE ($b = 1.62 \pm 0.73$, $n = 36$) (Fig. 14f).

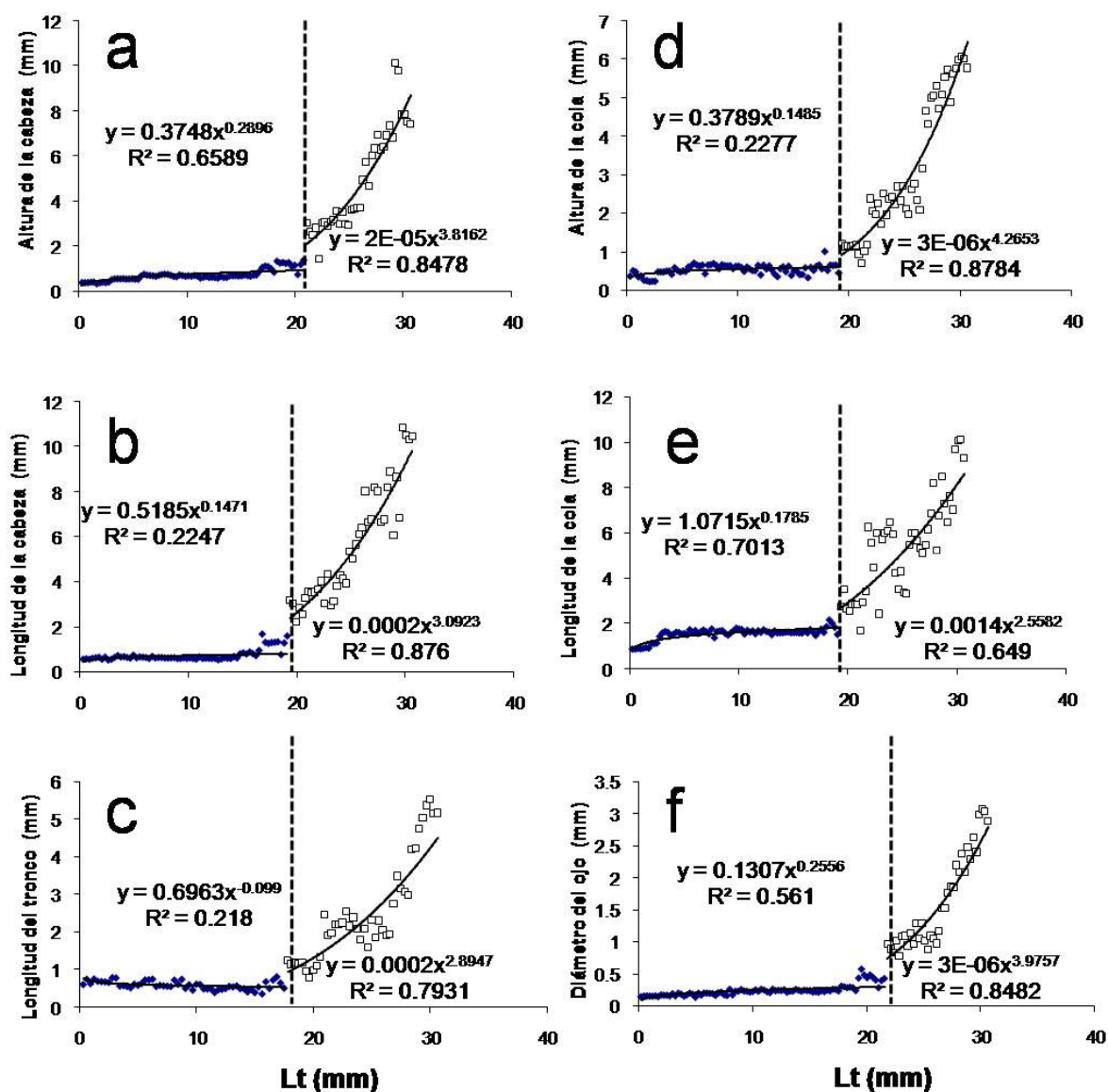


Fig. 14 Crecimiento alométrico de las diferentes estructuras del cuerpo seleccionadas: altura de la cabeza, longitud de la cabeza, longitud del tronco, altura de la cola, longitud de la cola y diámetro de los ojos en relación a la longitud total del cuerpo durante el desarrollo larvario en la cabrilla sardinera.

6.2 Ontogenia digestiva

6.2.1 Actividad de las proteasas en las larvas alimentadas

La actividad específica de la tripsina presenta ligeros incrementos progresivos hasta los 40 DPE donde se observa un incremento significativo ($P < 0.05$) de forma exponencial (Fig. 15 a, b); en la actividad individual se observan incrementos significativos ($P < 0.05$) a partir de los 20 DPE.

La actividad específica de la quimotripsina presenta su máximo nivel de actividad a los 7 DPE; posteriormente, se observa una disminución significativa ($P < 0.05$) hasta los 40 DPE (Fig. 15 c); la actividad individual de las larvas presenta incrementos significativos ($P < 0.05$) a partir de los 20 DPE (Fig. 15 d). La actividad específica de la proteasa ácida presenta mayor actividad a los 7 DPE, posteriormente la actividad disminuye de forma significativa ($P < 0.05$) hasta los 40 DPE (Fig. 15 e); la actividad individual presenta incrementos significativos a partir de los 20 DPE (Fig. 15 f).

La aminopeptidasa N presenta una actividad que se incrementa a medida que se desarrolla el cultivo, presentando dos descensos a los 7 DPE y otro a los 35 DPE (Fig. 16 a); la actividad específica en las larvas presenta incrementos significativos a partir de los 30 DPE. La actividad de la fosfatasa alcalina presenta un incremento constante de la actividad a lo largo de todo el experimento, aunque se observa una amplia dispersión en los datos a los 15 y 30 DPE (Fig. 16 c); la actividad individual en las larvas presenta incrementos significativos ($P < 0.05$) a partir de los 20 DPE (Fig. 16 d).

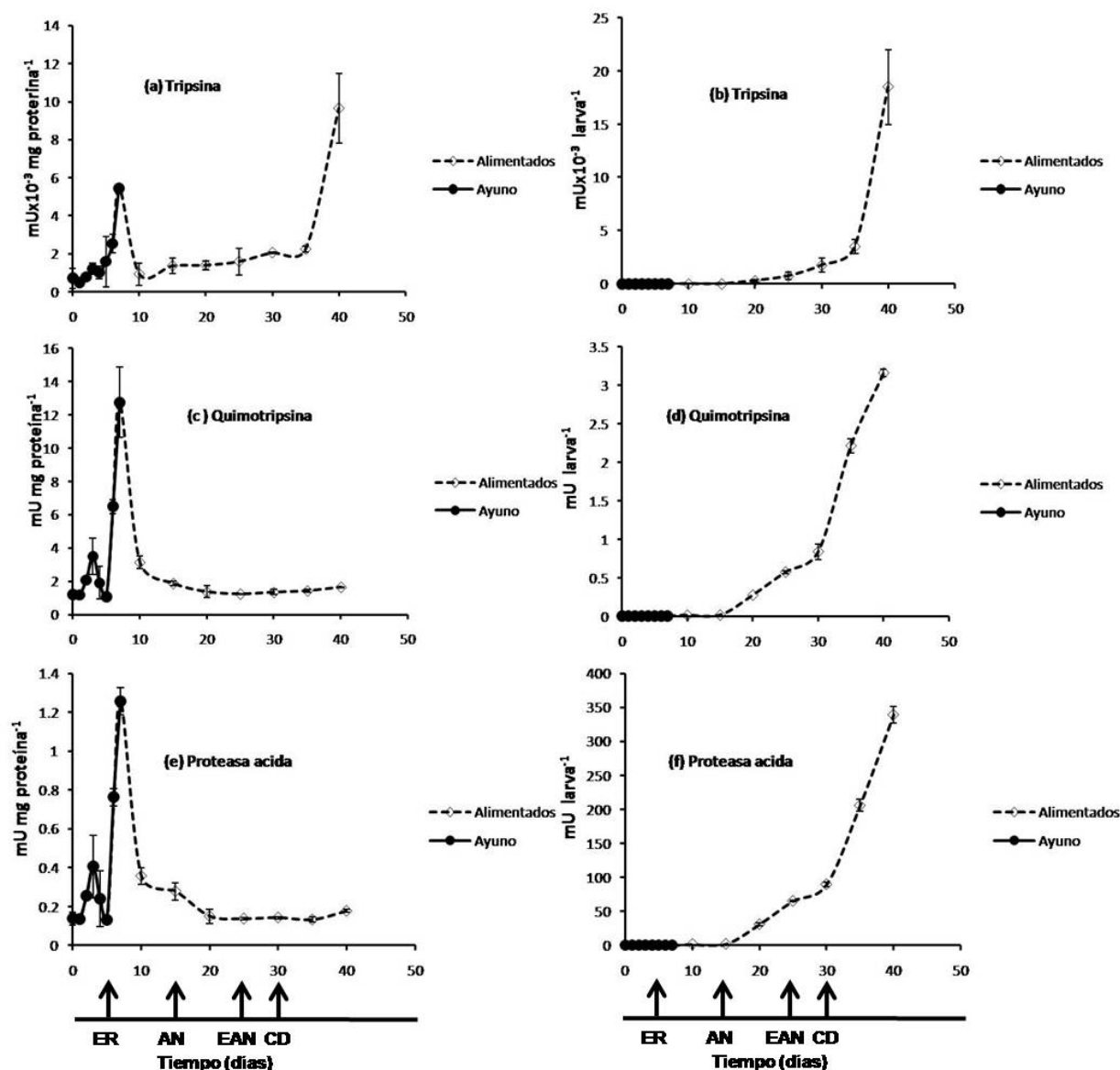


Fig. 15 Actividad de las enzimas digestivas durante el cultivo larvario de cabrilla sardinera (media \pm DS, $n = 3$). Actividad específica (a) e individual (b) de la tripsina, actividad específica (c) e individual (d) de la quimotripsina, actividad específica (e) e individual (f) de la proteasa acida. ER = rotíferos enriquecidos, AN = nauplios de artemia, EAN = nauplios de artemia enriquecidos, CD = alimento balanceado.

La actividad de la enzima intracelular leucina-alanina peptidasa presenta un patrón diferente a las demás proteasas, incrementándose a partir de los 3 DPE teniendo su pico máximo a los 15 DPE y posteriormente decrece gradualmente hasta los 40 DPE donde la

actividad es nula; durante todo el cultivo larvario se observa una dispersión amplia en los datos ($P>0.05$) no se observan diferencias significativas (Fig. 16 e).

6.2.2 Actividad de la amilasa, maltasa y lipasa en larvas alimentadas

La actividad específica de la amilasa se detecta a partir del 1 DPE con una tendencia al incremento conforme transcurre el tiempo, con una excepción a los 6 y 7 DPE donde no se detecta actividad (Fig. 17 a); la actividad individual para esta enzima presenta incrementos significativos a partir de los 30 DPE (Fig. 17 b).

La actividad específica de la maltasa se detectó previo a la eclosión, posteriormente presentó una actividad variable con incrementos a los 4 y 10 DPE hasta llegar a su mayor actividad a los 25 DPE; posteriormente existe un descenso en la actividad y se estabiliza a los 35 DPE manteniéndose en ese nivel hasta el final del experimento (Fig. 17 e). La actividad individual en las larvas presenta incrementos significativos a partir de los 20 DPE (Fig. 17 f).

La lipasa mantiene un nivel de actividad similar de los 10 a los 30 DPE. A partir de este punto se observa un incremento significativo ($P<0.05$) en la actividad hasta el final del experimento (Fig. 17 c); la actividad individual presenta incrementos significativos a partir de los 25 DPE (Fig. 17 d).

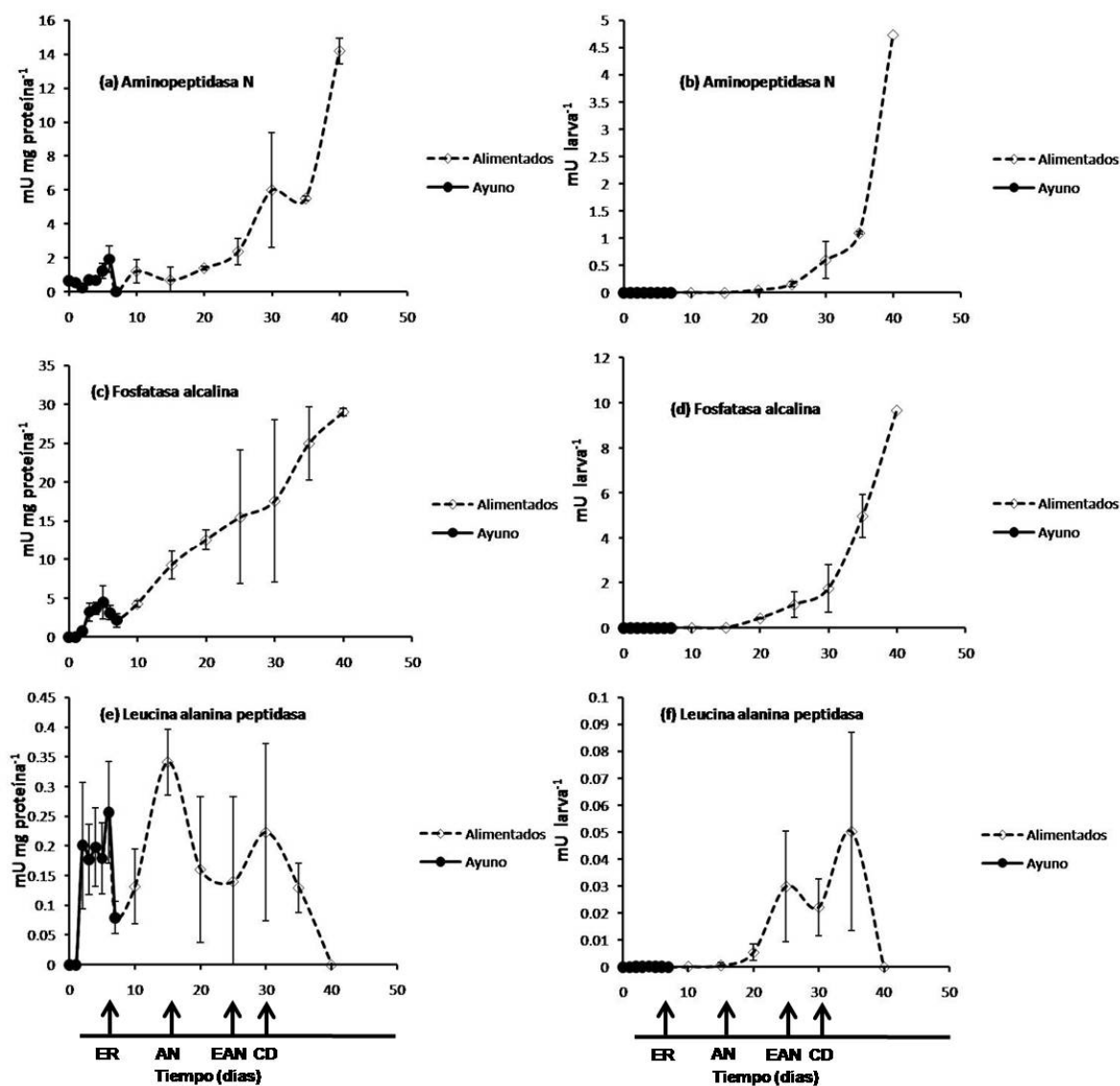


Fig. 16 Actividad de las enzimas digestivas durante el cultivo larvario de cabrilla sardinera (media \pm DS, $n = 3$). Actividad específica (a) e individual (b) de la aminopeptidasa N; actividad específica (c) e individual (d) de la fosfatasa alcalina; actividad específica (e) e individual (f) de la leucina alanina peptidasa. ER = rotíferos enriquecidos, AN = nauplios de artemia, EAN = nauplios de artemia enriquecidos, CD = alimento balanceado.

6.2.3 Actividad de las proteasas en larvas en ayuno

La actividad de la tripsina se detectó previamente a la eclosión de los huevos y su incremento fue progresivo hasta el 7 DPE donde se detectó la mayor actividad ($P < 0.05$) (Fig. 15 a). La actividad de la quimotripsina se detectó previo a la eclosión y posteriormente se observaron dos picos de actividad a los 3 y a los 7 DPE donde los incrementos fueron significativos ($P < 0.05$) (Fig. 15 c). La actividad de la proteasa ácida se detectó antes de la eclosión y presentó fluctuaciones con un pico de actividad a los 3 DPE, disminuye posteriormente hasta el 5 DPE donde incrementó significativamente ($P < 0.05$) en los 6 y 7 DPE (Fig. 15 e).

La actividad de la enzima aminopeptidasa N se detectó previo a la eclosión con pocas variaciones hasta el día 5 donde comenzó el incremento que es significativo ($P < 0.05$) con su pico máximo al 6 DPE, para disminuir posteriormente el 7 DPE (Fig. 16 a). La actividad de la leucin alanina peptidasa se detectó a partir de los 2 DPE y a partir de este punto presentó una actividad similar hasta el 6 DPE donde es el pico de máxima actividad. Posteriormente, la actividad disminuyó de forma significativa ($P < 0.05$) el 7 DPE (Fig. 16 e). La actividad de la enzima fosfatasa alcalina se detectó a partir del 2 DPE incrementándose de forma significativa a partir del 3 DPE ($P < 0.05$) y se observó el pico de máxima actividad el 5 DPE; a partir de este punto la actividad disminuye (Fig. 16 c).

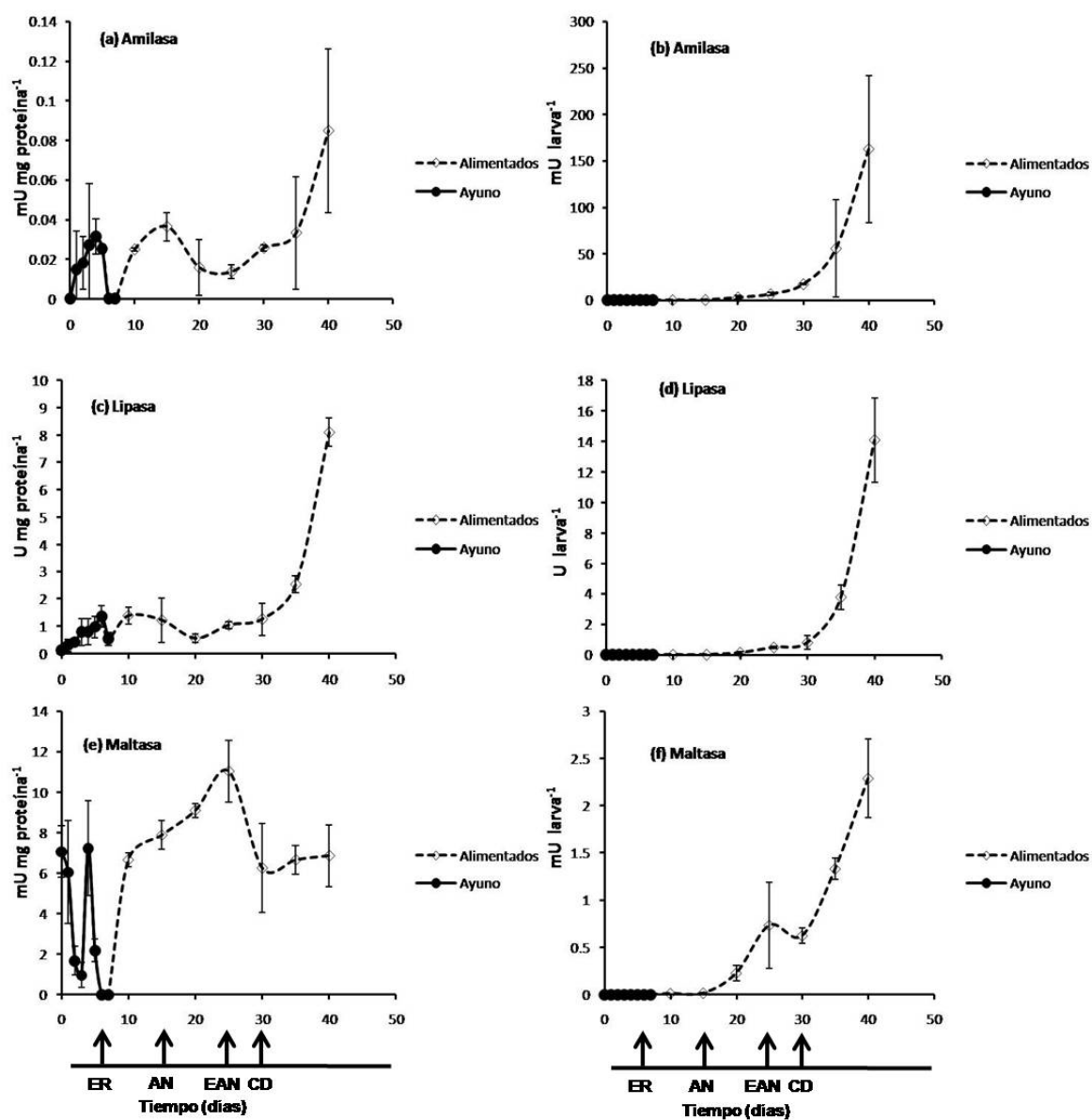


Fig. 17 Actividad de las enzimas digestivas durante el cultivo larvario de cabrilla sardinera (media \pm DS, n = 3). Actividad específica (a) e individual (b) de la amilasa; actividad específica (c) e individual (d) de la lipasa; actividad específica (e) e individual (f) de la maltasa. ER = rotíferos enriquecidos, AN = nauplios de artemia, EAN = nauplios de artemia enriquecidos, CD = alimento balanceado.

6.2.4 Actividad de la amilasa, maltasa y lipasa en larvas en ayuno

Se detectó actividad de la amilasa a partir del 1 DPE y a partir de ese momento presenta incrementos graduales hasta alcanzar un pico máximo de actividad el 5 DPE. Después disminuye de forma significativa ($P < 0.05$) (Fig. 17 a).

La actividad de la maltasa se detectó antes de la eclosión, posteriormente la actividad comienza a disminuir hasta los 3 DPE, donde se observó la menor actividad; a partir de este momento la actividad comenzó a incrementar en el 4 y 5 DPE y posteriormente la actividad disminuyó de forma significativa ($P < 0.05$) (Fig. 17 e).

La actividad de la lipasa se detectó antes de la eclosión, a continuación se incrementó su actividad hasta el 6 DPE donde alcanzó su pico máximo y posteriormente la actividad disminuyó; debido a la dispersión en los datos no se detectaron cambios significativos en la actividad de esta enzima ($P > 0.05$) (Fig. 17 c).

6.2.5 Comparación de la actividad digestiva entre las larvas alimentadas y las larvas mantenidas en ayuno

No se encontraron diferencias significativas ($P > 0.05$) en la actividad específica ni en la actividad individual entre las larvas alimentadas y las larvas mantenidas en ayuno en los primeros 7 DPE.

6.3 Descripción histológica

6.3.1 Crecimiento y desarrollo del sistema digestivo

La longitud total de las larvas al eclosionar fue de 1.96 ± 0.23 mm y de 24.18 ± 2.04 mm a los 40 DPE (Fig. 11). En el 1 y 2 DPE la boca no está formada y el tubo digestivo se desarrolla en la parte media del cuerpo paralelo al notocordio y sobre el saco

de vitelo. En este momento la cavidad bucal esta cerrada al igual que el ano, el cual se conecta con la vejiga urinaria y el intestino incipiente (Fig. 18a). Las principales glándulas observadas son el páncreas y el hígado (Fig.18b), y en el transcurso del experimento se pudieron diferenciar la región: bucofaríngea, el esófago y el intestino.

6.3.2 Región Bucofaríngea

La cavidad bucofaríngea no está formada en el momento de la eclosión, únicamente se distinguen un conjunto de células del epitelio escamoso donde posteriormente se formará la cámara branquial y la boca, esta se abre a los 3 DPE. En el 10 DPE se observan por primera vez las células caliciformes estas son más abundantes en la parte posterior de la cavidad bucofaríngea y también se observan las lamelas de las pseudo-branquias (Fig. 18c) que posteriormente formarán los arcos branquiales los cuales se observan a los 25 DPE (Fig. 18d).

6.3.3 Esófago

En la parte posterior de la faringe, se encuentra un tramo corto que podría denominarse esófago; el lumen del esófago no muestra vellosidades durante todo el desarrollo de las larvas. Esta región del tracto digestivo está formada principalmente por epitelio escamoso estratificado y une la cavidad bucofaríngea con el intestino. Posteriormente éste se ensanchará y dará lugar al estómago donde se ubica la pre-válvula del intestino (Fig. 19a).

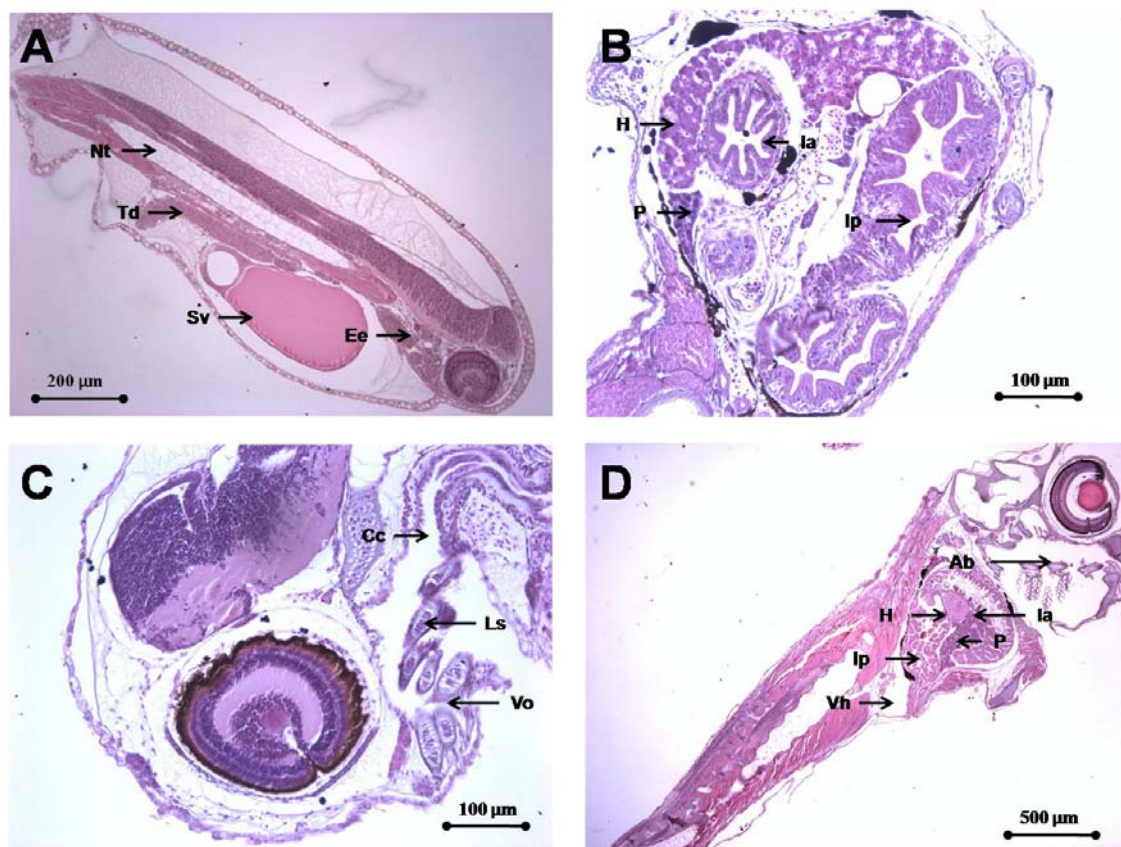


Fig. 18 Desarrollo del sistema digestivo de la cabrilla sardinera. Larvas en el periodo previo a la primera alimentación (A); sistema digestivo de las larvas al 1 DPE (B); región buco faríngea (C); larva a los 25 DPE (D). A- abreviaturas (Nt = notocordio; Td = tubo digestivo; Sv = saco de vitelo; Ee = epitelio escamoso). B- abreviaturas (P = páncreas; la = intestino anterior; lp = intestino posterior; H = hígado). C- abreviaturas (Vo = válvula oral; Ls = lamelas pseudo branquiales; Cc = células caliciformes). D- abreviaturas (Ab = arco branquial; P = páncreas; H = hígado; Vh = vejiga urinaria; la = intestino anterior; lp = intestino posterior).

A partir de los 15 DPE el esófago es rodeado por una capa circular de musculo estriado (Fig. 19b) en este punto se ha incrementado el numero de células de mucosa formadas por epitelio cúbico simple, a partir de este punto no se observan cambios significativos en esta sección del tubo digestivo hasta la diferenciación del estómago.

6.3.4 Estómago

El estómago fue el último órgano del sistema digestivo en diferenciarse. En el 10 DPE se observa el ensanchamiento del tubo digestivo en la sección posterior al esófago, que está formado por células de epitelio cúbico simple. En este periodo, esta sección se encuentra junto al hígado y no se observan células acinares (Fig. 19a). A los 35 DPE se observa ya el ensanchamiento del intestino en la zona anterior formando el estómago con las membranas mucosa y submucosa ya diferenciadas pero aun no se observan las células gástricas ni la lámina propia y las paredes del mismo aún carecen de pliegues (Fig. 20c). A los 40 DPE la túnica muscular ya está bien desarrollada, se observa claramente el cardias, el esfínter pilórico y las células acinares rodeadas por tejido conectivo especialmente en la región del fundus, hay numerosos pliegues en la túnica mucosa (Fig. 19c,d)

6.3.5 Intestino

Al eclosionar, la larva, posee el canal alimentario que se observa como un tubo recto que pasa por encima del saco de vitelo, y está cerrado hacia la boca y el ano; histológicamente no se observan diferencias a lo largo del mismo (Fig. 18a). Este órgano está formado por una capa de mucosa, así como una sub-mucosa muscular y serosa poco desarrollada. El tubo incipiente permanece sin cambios hasta el momento que se agotan las reservas de vitelo y la gota de aceite.

Este momento coincide con la primera alimentación donde comienza la diferenciación del mismo en la sección buco faríngea, tubo anterior, medio y posterior (Fig. 20a). A los 10 DPE los enterocitos son evidentes mostrando una estructura celular característica que nos indica que este epitelio ya está maduro y las micro-vellosidades son evidentes (Fig. 20b).

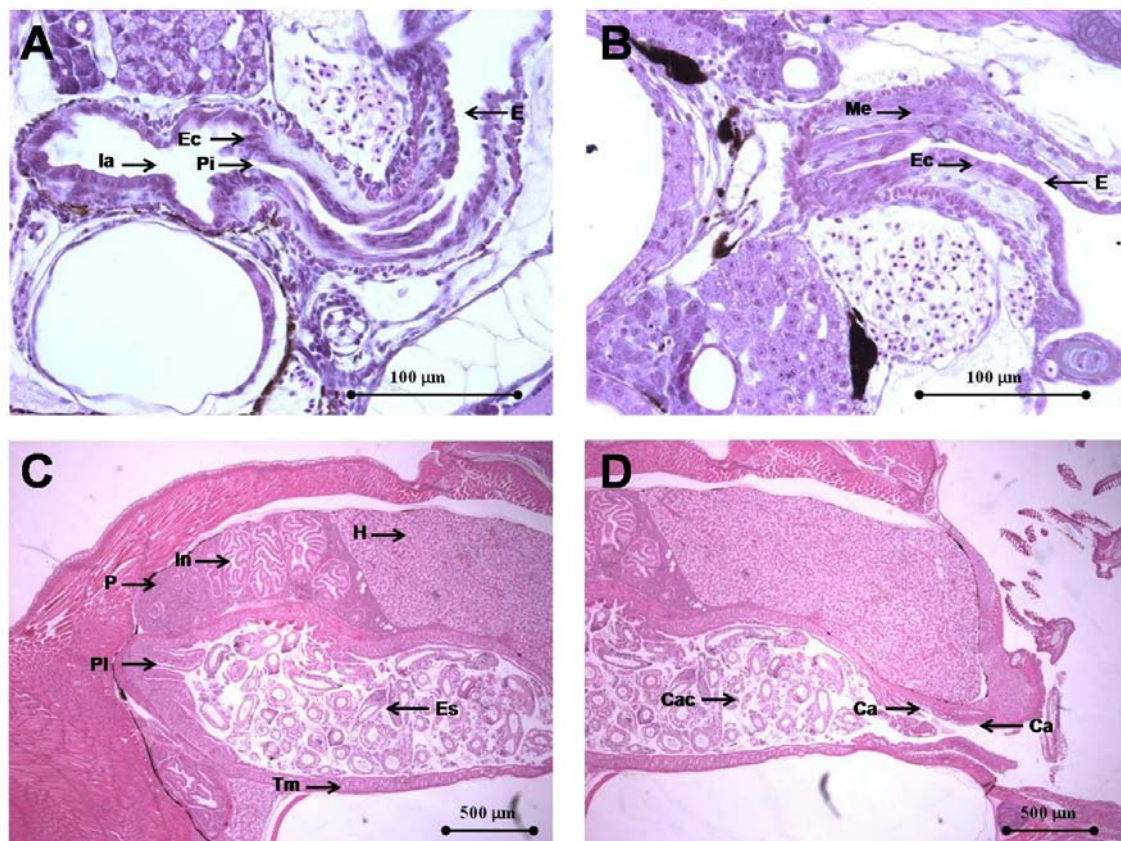


Fig. 19 Desarrollo del sistema digestivo de la cabrilla sardinera. Esófago é intestino anterior (A); esófago a los 15 DPE (B); estómago a los 40 DPE (C, D). A- abreviaturas (E = esófago; la = intestino anterior; Ec = epitelio cúbico simple; Pi = pre válvula del intestino). B- abreviaturas (E = esófago; Me = músculo estriado; Ec = epitelio cúbico simple). C- abreviaturas (H = hígado; In = intestino; P = páncreas; Tm = túnica muscular; Es = estómago; PI = píloro). D- abreviaturas (Ca = cardias; Cac = células acinares).

En la parte posterior del tubo digestivo los enterocitos forman un epitelio tipo cilíndrico simple con micro-vellosidades; hacia la parte terminal, se aprecia el orificio anal el cual presenta las mismas características morfológicas que el intestino posterior. Hacia los 15 DPE la sección anterior del tubo digestivo se expande y en ella se almacena alimento, se observan micro-vellosidades, vacuolas y enterocitos y la parte posterior del intestino mantiene las mismas características, lo que nos indica que aun no hay proceso de diferenciación entre estas dos regiones (Fig. 20c). A los 25 DPE los pliegues en la zona

anterior del intestino se incrementan extendiendo sus crestas hacia el lumen intestinal. Estas crestas están recubiertas en su totalidad de micro-vellosidades; que en la zona posterior del intestino se observan de menor tamaño y en el recto ya solamente se observan células aplanadas. En La submucosa se observan pequeñas inclusiones lipídicas, numerosos vasos y la túnica muscular se observa poco desarrollada. En este periodo no se observan cambios posteriores hasta los 40 DPE (Fig. 20d).

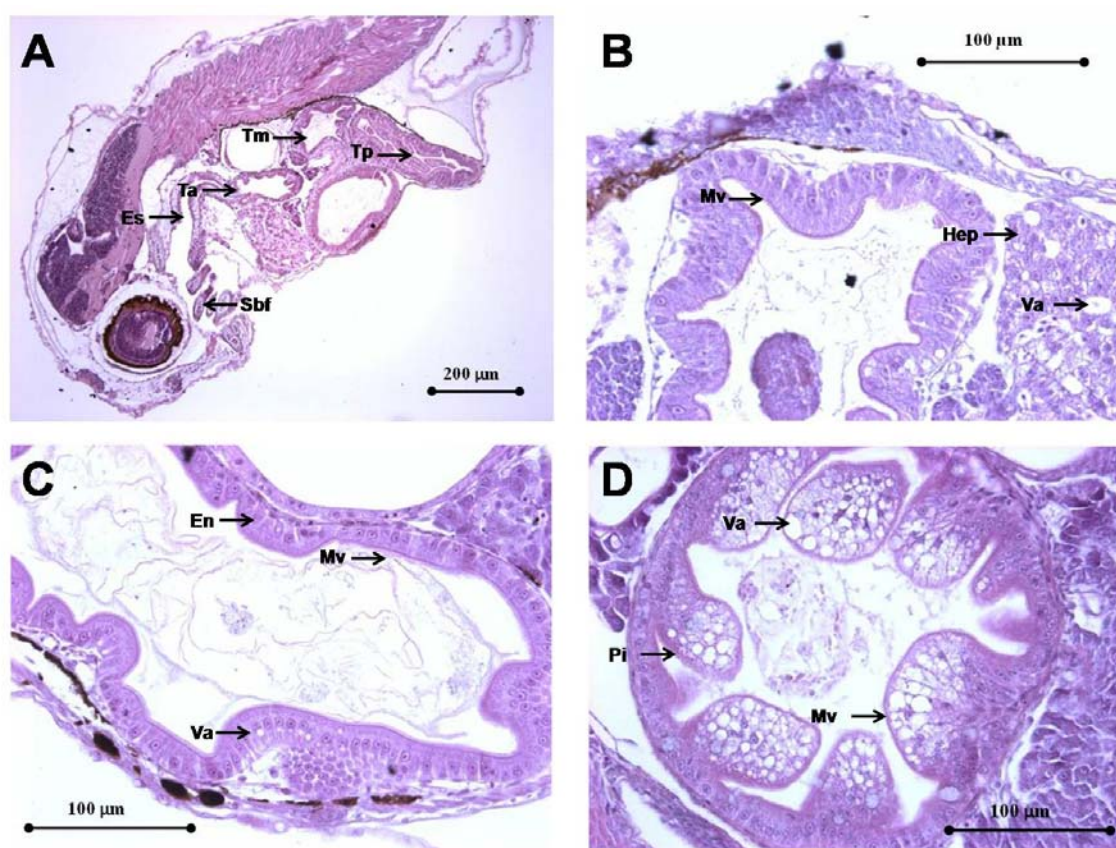


Fig. 20 Desarrollo del sistema digestivo de la cabrilla sardinerá. Secciones del intestino (A); Intestino anterior a los 10 DPE (B); Intestino anterior a los 15 DPE (C); Pliegues del intestino a los 25 DPE (D). A- abreviaturas (Sbf = sección buco faríngea; Es = Esófago; Ta = tubo anterior; Tm = tubo medio; Tp = tubo posterior). B- abreviaturas (Hep = hepatocitos; Va = vacuolas; Mv = micro-vellosidades). C- abreviaturas (En = enterocitos; Va = vacuolas; Mv = micro-vellosidades). D- abreviaturas (Pi = pliegues intestinales; Mv = micro-vellosidades; Va = vacuolas).

6.3.6 Glándulas accesorias

El hígado y el páncreas se observan a partir del 1 DPE; el hígado se encuentra dentro de la cavidad visceral este se ubica en la parte anterior y de forma bilobular, en medio de los dos lóbulos se observa el páncreas. El parénquima hepático es ya un tejido maduro, se alcanzan a reconocer cordones de hepatocitos (Fig. 18b), y no se observa la vesícula biliar.

El Epitelio pancreático está formado, por una parte endocrina y otra exocrina, por la morfología celular se puede decir que el órgano está maduro formado por los acinos serosos y las células son de forma redondeada. La parte endocrina se representa por los islotes de Langerhans (Fig. 21a). A partir del 10 DPE las células del hígado se observan más continuas y abundantes y el hígado es de mayor tamaño. A los 25 DPE aparecen las primeras vacuolas en el hígado como una forma de almacenamiento de lípidos y glucógeno (Fig. 21b).

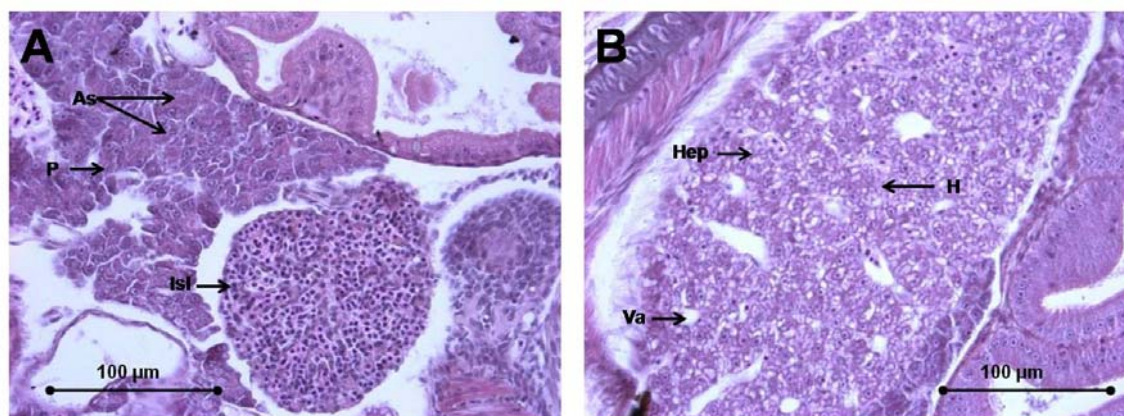


Fig. 21 Desarrollo del sistema digestivo de la cabrilla sardinera. Páncreas (A); hígado (B). A- abreviaturas (P = páncreas; Isl = islotes de langerhans; As = acinos serosos). B- abreviaturas (H = hígado; Hep = hepatocitos; Va = vacuolas).

6.4 Evaluación del crecimiento y la supervivencia de las larvas alimentadas con diferentes tipos de presa en la primera alimentación.

6.4.1 Crecimiento

Las larvas no presentaron diferencias significativas en el crecimiento durante los días 4, 6 y 8 ($P > 0.05$) a excepción del testigo donde no hubo crecimiento en el día 0 en el día 8 debido a la mortalidad del 100% de los individuos (Fig. 22).

6.4.2 Supervivencia

No se observaron diferencias significativas ($P > 0.05$) en la supervivencia de las larvas alimentadas con las diferentes dietas evaluadas a los 4 y 6 DPE; en el 8 DPE se observaron diferencias significativas ($P < 0.05$) en los organismos alimentados con trocóforas que presentaron una mayor supervivencia. Y el testigo que presentó una supervivencia de 0 (Fig. 23).

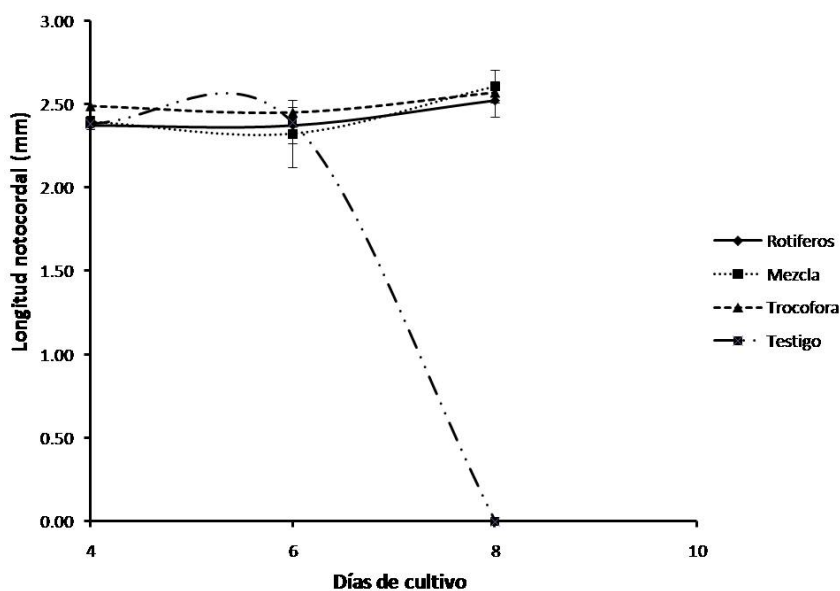


Fig. 22 Crecimiento de las larvas de cabrilla sardinera alimentadas con diversos tipos de presas en los primeros 8 días de vida.

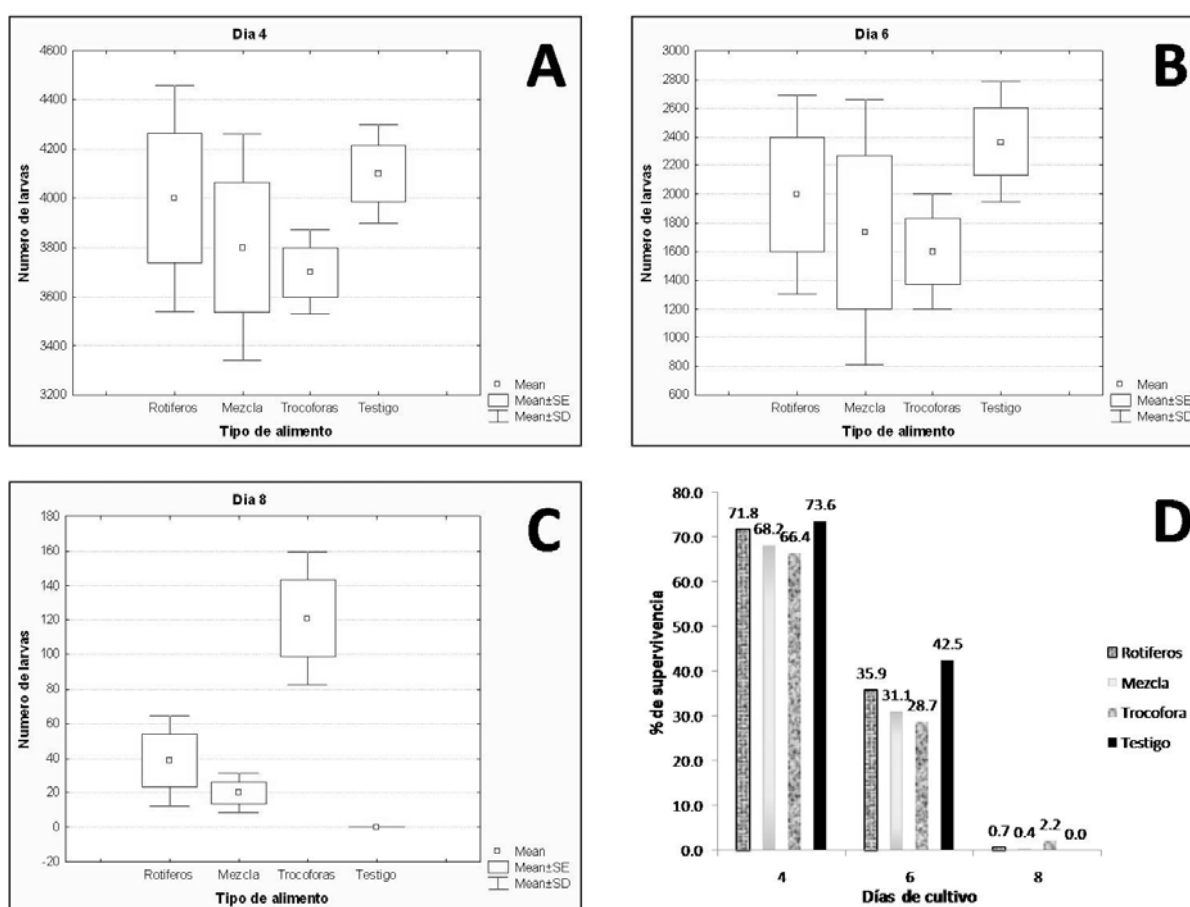


Fig. 23 Supervivencia de las larvas de cabrilla sardinera en los primeros días de vida alimentadas con distintos tipos de presas. (A = 4 DPE; B = 6 DPE; C = 8 DPE; D = supervivencia expresada en %).

6.5 Evaluación del crecimiento y supervivencia de las larvas alimentadas con diferentes densidades de presas en la primera alimentación

6.5.1 Crecimiento

No se observaron diferencias significativas ($P > 0.05$) en el crecimiento de las larvas en los distintos tratamientos a los 4 y 6 DPE; tampoco se observaron diferencias a los 8 DPE entre los tratamientos donde se dieron 10 y 18 presas/mL, todos los demás tratamiento presentaron mortalidad del 100% (Fig. 24)

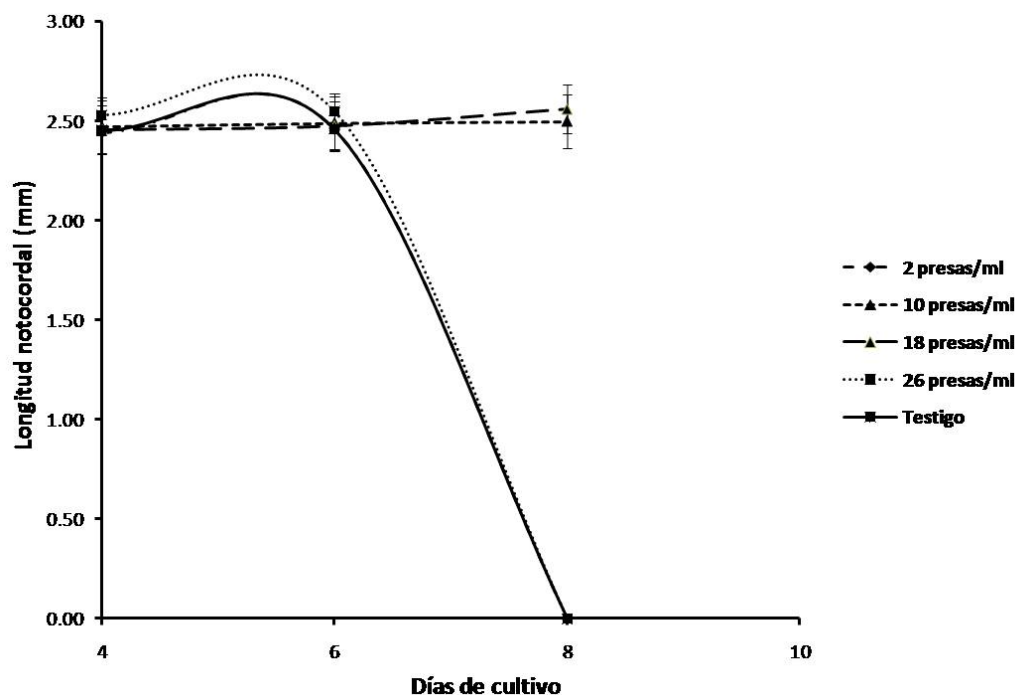


Fig. 24 Crecimiento de las larvas de cabrilla sardinera alimentadas con distintas densidades de presas en los primeros días de vida.

6.5.2 Supervivencia

No se observaron diferencias significativas ($P > 0.05$) en la supervivencia de las larvas alimentadas con diferentes densidades de presas a los 4 y 6 DPE; en el 8 DPE se observaron diferencias significativas ($P < 0.05$) en los organismos alimentados con 10 presas y 18 presas. Todos los demás tratamientos presentaron una mortalidad del 100% (Fig. 25).

Al 8 DPE se observó un incremento significativo ($P < 0.05$) en el contenido de amonio del tratamiento donde se alimentó con 26 presas/mL (Fig. 26).

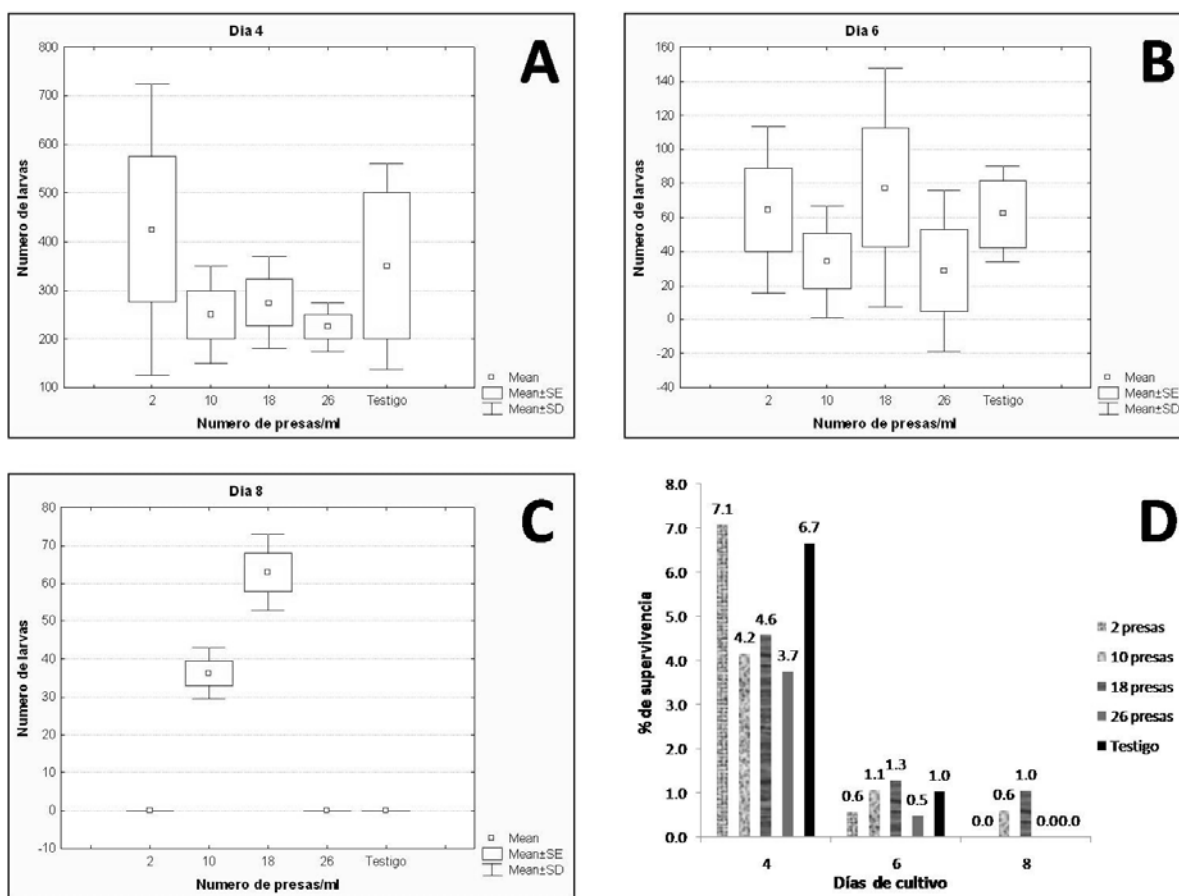


Fig. 25 Supervivencia de las larvas de cabrilla sardinera alimentadas con distintas densidades de presas en los primeros días de vida (A = 4 DPE; B = 6 DPE; C = 8 DPE; D = supervivencia expresada en %).

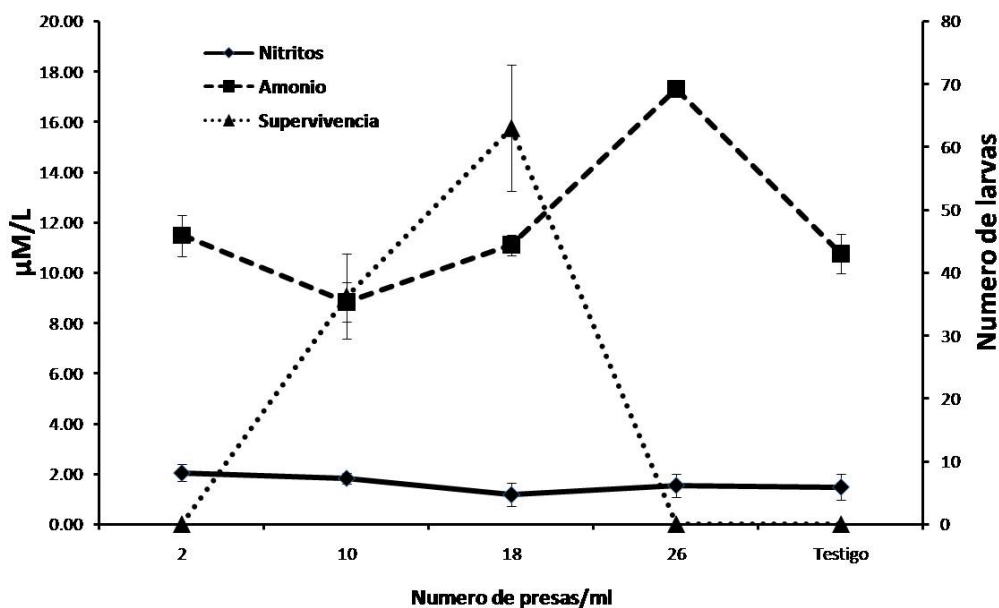


Fig. 26 Supervivencia de las larvas de cabrilla sardinera alimentadas con distintas densidades de presas en relación con el contenido de nitritos y amonio en el agua de cultivo en los primeros días de vida.

6.6 Evaluación del efecto de la intensidad de la luz en el crecimiento y supervivencia de las larvas durante la primera alimentación

6.6.1 Crecimiento

No se observaron diferencias significativas ($P > 0.05$) en el crecimiento de los organismos de los distintos tratamientos a los 4, 6 y 8 DPE. Los organismos del testigo presentaron una mortalidad del 100% a los 8 DPE. (Fig. 27)

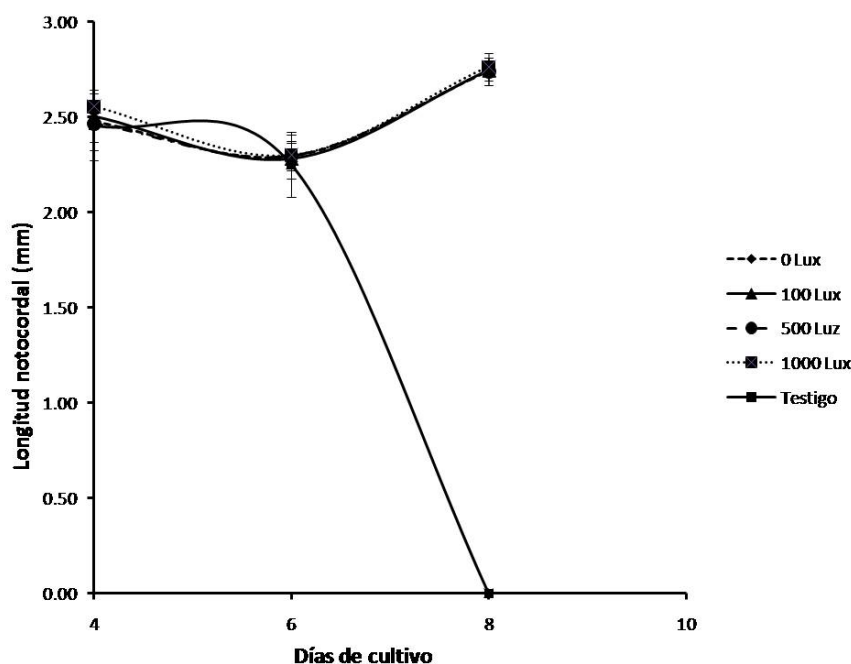


Fig. 27 Crecimiento de las larvas de cabrilla sardinera en los primeros días de vida sometidos a distintas intensidades de luz.

6.6.2 Supervivencia

No se observaron diferencias significativas ($P > 0.05$) a los 4 DPE en los distintos tratamientos evaluados; a los 6 DPE se observaron diferencias significativas ($P < 0.05$) en los organismos mantenidos en oscuridad absoluta, que presentaron una menor supervivencia. A los 8 DPE se observaron diferencias significativas ($P < 0.05$) en los organismos mantenidos en oscuridad absoluta que presentaron una menor supervivencia, los organismos mantenidos en 100 y 500 lux no presentaron diferencias entre sí. Los organismos mantenidos a 1000 lux presentaron la mayor supervivencia y se observaron diferencias significativas en relación a los demás tratamientos (Fig. 28).

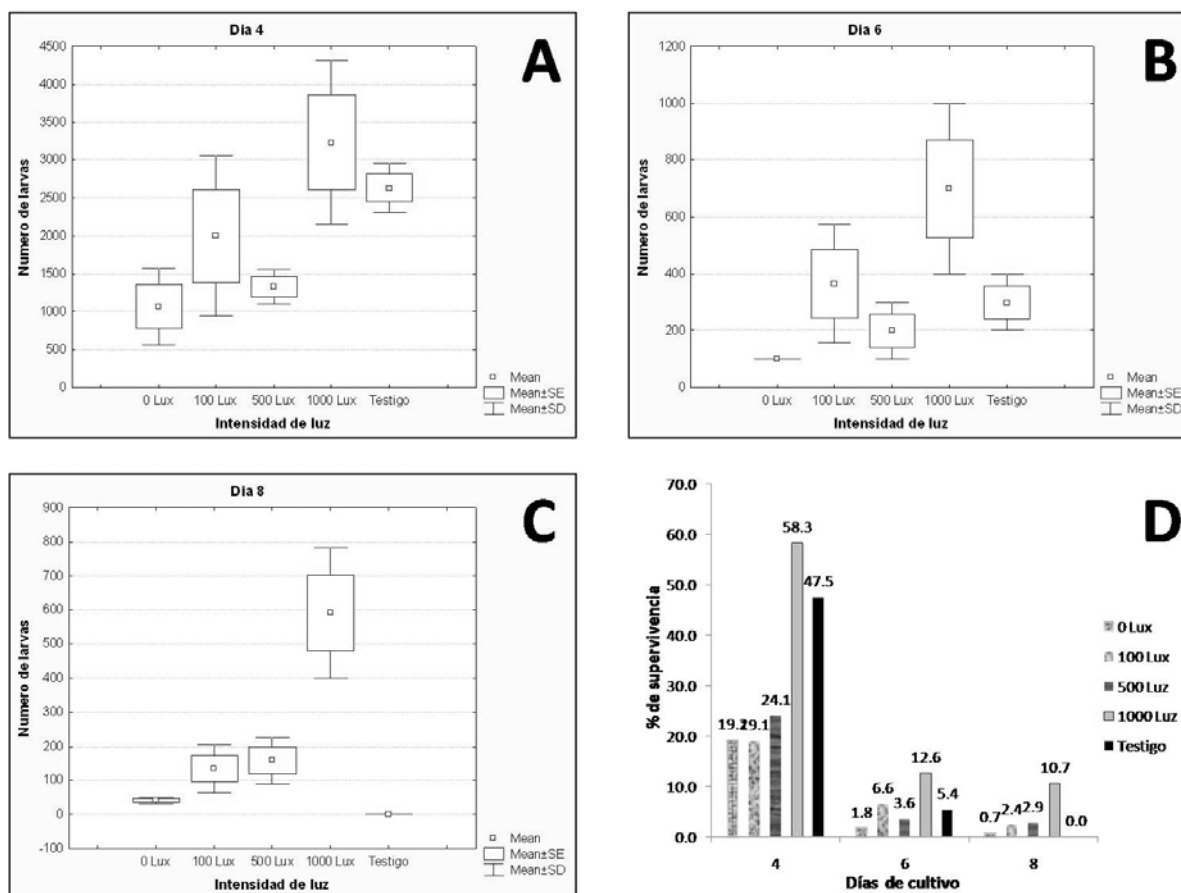


Fig. 28 Supervivencia de las larvas de cabrilla sardinera en los primeros días de vida sometidas a distintas intensidades de luz (A = 4 DPE; B = 6 DPE; C = 8 DPE; D = supervivencia expresada en %).

7 Discusión

7.1 Desarrollo morfológico y modelo de crecimiento

Mycteroperca rosacea al igual que todos los meros presenta una ontogenia indirecta, con un desarrollo larvario rápido, caracterizado por cambios en su tamaño y morfología (Kendall 1984; Leis 1987; Gegadis *et al.* 2006); estos cambios fueron descritos tanto en el periodo embrionario como larvario por Gracia-López *et al.* (2004a) y Martínez-Lagos y Gracia-López (2009). En el presente trabajo, el periodo larvario de *Mycteroperca rosacea* hasta su transformación a juvenil ocurrió en 60 DPE a una temperatura de 25 °C tiempo en el cual el 100 % de los organismos muestreados habían completado su metamorfosis. Tomando en cuenta la teoría de los saltos en la ontogenia que comprende las diferentes fases descritas por (Balon 1985), el desarrollo larvario de la cabrilla sardinera se ha dividido en 8 diferentes estadios de acuerdo a las diferentes características morfológicas que presentan las larvas durante su metamorfosis; la fase de larva con saco de vitelo en el desarrollo larvario se ubica en el periodo entre la eclosión (estadio 1), la absorción del saco de vitelo, pigmentación de los ojos y apertura de la boca (estadio 2), estos son los eventos que caracterizan esta fase del desarrollo larvario y son similares en la mayoría de las especies de Serranidos de interés comercial en acuicultura (Tucker 1998). Los principales eventos morfológicos en el periodo larvario de esta especie de acuerdo a los trabajos de Kendall *et al.* (1984) y Balon (1985) son la fase de preflexión que se dio de los 4 a 20 DPE en los estadios 3 y 4, la fase de flexión ocurrió entre los 21 y 25 DPE en el estadio 5 y la fase de posflexión hasta completar la metamorfosis que fue de los 26 a 60 DPE durante los estadios 6 al 8. La longitud total de los juveniles a los 60 días fue de 30.6 mm en promedio.

En las larvas de peces marinos, el periodo larvario dependiendo de la especie y de la temperatura en la que se desarrolle el cultivo, puede variar en duración, generalmente las especies de climas templados presentan un periodo larvario más largo que las especies de clima tropical como la lobina Europea *Dicentrarchus labrax* (Bernabé 1990; Sweetman 1992), el fletán *Hippoglossus hippoglossus* (Bolla y Holmefjord 1988). La relación del tiempo de cultivo y el crecimiento en las larvas puede variar dependiendo de la especie y de los valores de los parámetros ambientales que regulan el crecimiento. Se ha evaluado la influencia de la temperatura (Steinarsson y Björnsson 1999; Benoit y Pepin 1999) como uno de los parámetros ambientales que afecta directamente el crecimiento y el tiempo de desarrollo de las larvas. El uso inadecuado de este parámetro, puede tener efectos negativos en el cultivo; actualmente para reducir el tiempo de cultivo larvario en algunas especies de Serranidos se incrementa la temperatura gradualmente de acuerdo con el grado de desarrollo de las larvas (Wang *et al.* 2001; Zhang *et al.* 2006; Xie *et al.* 2007).

Los cultivos larvarios de los meros se desarrollan en el rango de temperatura de 20 y 31 °C dependiendo de la especie; de esta forma, podemos mencionar que el tiempo del cultivo larvario de la cabrilla sardinera es similar al reportado para *Epinephelus septemfasciatus* (Thunberg 1793) cultivado entre 21.2 y 23.2 °C (Kitajima *et al.* 1991) y *Epinephelus merra* (Bloch 1793) cultivado entre 26.5 y 29.5 °C (Jagadis *et al.* 2006). Está claro que los cultivos efectuados a temperaturas más elevadas, pueden ayudar a reducir los periodos larvales, esto se ha demostrado incluso en el caso de la cabrilla sardinera por Gracia-López *et al.* (2005), quien reporta haber obtenido juveniles a los 47 días de cultivo a una temperatura de 26.7 ± 1 °C. En otras especies de Serranidos importantes para la acuicultura, como *Epinephelus akaara* (Temminck y Schlegel, 1842) el periodo hasta la

metamorfosis es de 45 días cuando la temperatura del cultivo está entre 25 y 29 °C (Wang *et al.* 2001), *Epinephelus coioides* (Hamilton, 1822) necesita 42 días a una temperatura entre 24.5 y 29.2 °C (Zhang *et al.* 2006), aunque para esa misma especie se reportan 39 días a una temperatura superior (28.5 y 31 °C) (Xie *et al.* 2007). Como se observa en los trabajos citados anteriormente, los rangos de temperatura para los cultivos de los meros es amplio, lo importante en este punto, es determinar en qué momento se debe incrementar la temperatura para disminuir el tiempo del mismo y optimizar el uso de las instalaciones en los laboratorios. A sí mismo, puede afectar al crecimiento de las larvas la intensidad de luz, fotoperiodo, (Downing y Litvak 1999; Shiri *et al.* 2004) y la salinidad (von Oertzen 1985; Tandler *et al.* 1995).

En el presente estudio, se enfatiza la importancia del tamaño de la boca de las larvas a lo largo del cultivo larvario, ya que esta información nos orienta sobre el tamaño apropiado de la partícula de alimento que debemos proporcionar a las larvas durante su desarrollo. La apertura de la boca de las larvas de la cabrilla sardinera ocurrió entre 3 y el 4 DPE, su tamaño inicial fue de $126 \mu\text{m} \pm 25 \mu\text{m}$; considerando el tamaño de los rotíferos de la cepa utilizada (*Brachionus plicatilis*, 50-250 μm) fue necesario tamizar el alimento a 75 μm , suministrando este alimento tamizado hasta el 7 DPE para hacer posible la ingestión del mismo por las larvas. En el cultivo larvario de peces marinos se recomienda que el tamaño del alimento sea de aproximadamente el 50% del tamaño de la apertura de la boca (Shirota 1970; Kohno *et al.* 1997). Uno de los principales problemas en el cultivo de los meros son las altas mortalidades entre los 5 y 9 DPE (Kohno *et al.* 1990; Doi *et al.* 1991) ya que una de las principales causas de la muerte es el tamaño de la boca con relación al tamaño del alimento proporcionado. Es necesario conocer el tamaño de la boca para hacer

posible una primera alimentación efectiva en este periodo. Para solventar este problema en el cultivo larvario varios autores (Lin *et al.* 1986; Kitajima *et al.* 1991 y Gracia-López *et al.* 2005), han utilizado larvas trocóforas de bivalvos en la primera alimentación, a pesar de que esta alternativa pueda representar problemas técnicos, principalmente por la disponibilidad de bivalvos maduros que produzcan larvas trocóforas viables en el momento que se necesitan para usarlas como alimento en los cultivos larvarios de los peces así como su disponibilidad en laboratorios donde no existan esos cultivos. Otra alternativa propuesta es la utilización de copépodos como primer alimento en los cultivos larvarios (Kitajima *et al.* 1991; Doi *et al.* 1997; Xie *et al.* 2007) aunque este tipo de organismos sea el alimento natural de las larvas de peces, tenga un menor tamaño que los rotíferos y posea un mejor perfil nutricional que otros alimentos utilizados en el cultivo de larvas, puede representar problemas técnicos en cultivos a escala comercial. Entre los problemas más importantes se pueden mencionar, un ciclo de vida largo, lo que nos dificulta la obtención diaria y continua de copepoditos para abastecer las necesidades de alimento en un laboratorio comercial. Además la diversidad de cepas utilizadas varían mucho entre sí, lo que podría afectar la cantidad, el tipo y la calidad de los copepoditos obtenidos y a su vez esto podría afectar la calidad y cantidad de de peces juveniles que se obtienen en los cultivos larvarios (Rippingale y Payne 2001).

Seleccionar los rotíferos del tamaño apropiado puede ser una de las formas más prácticas para proporcionar el primer alimento a las larvas de cabrilla sardinera, pero éste debe ser tamizado al menos a 75 μm y proporcionado de forma continua en el cultivo; esta metodología ya se ha implementado con éxito relativo en otras especies de Serranidos (Doi *et al.* 1991; Lim 1993; Kayano y Mito 1994).

Durante el cultivo larvario, al analizar la relación de la longitud total vs el tamaño de la boca se deduce que en esta especie se puede omitir el uso de metanauplios de *Artemia* ya que la tasa de crecimiento de las larvas nos indica un rápido incremento en el tamaño de la boca y el cambio de larvas con un tamaño de boca de 1 mm a larvas con tamaño de boca de 2 mm lo cual transcurre en una semana; Esto nos permite suministrar a las larvas dietas microparticuladas porque el tamaño de su boca lo permite.

Una de las principales características de las larvas de los meros es el crecimiento de grandes espinas en las aletas dorsal y pélvicas (Heemstra y Randall 1993) cuya principal función de estas espinas es la defensa contra la depredación (Fukuhara y Fushimi 1988). En los cultivos larvarios y en ausencia de otros depredadores, este fenómeno se presenta entre individuos de la misma especie, cuando existe una dispersión de tallas, y se denomina canibalismo. El canibalismo puede representar hasta un 90% de las pérdidas del potencial de producción en la larvicultura de peces marinos (Parazo *et al.* 1991). En la cabrilla sardinera, la aparición de éstas ocurre entre los 10 y 15 DPE y la longitud máxima de las espinas puede representar hasta un 81% de la longitud total del cuerpo de las larvas a los 20 DPE. Estas espinas se pigmentan en las puntas, presentan bordes aserrados y posiblemente sirvan para el equilibrio de las larvas en la columna de agua. Durante el experimento se observó que al ser depredada una larva con las espinas desarrolladas muere el predador en la mayoría de los casos. El gran tamaño de las espinas en esta especie, nos indica que el periodo crítico de canibalismo comenza entre los 55-60 DPE en organismos con una L_t 30 mm; periodo posterior a lo reportado en *Epinephelus striatus* Bloch, 1792 por Watanabe *et al.* 1996 y *Epinephelus fuscoguttatus* Forsskål, 1775 por Lim 1993.

El crecimiento alométrico ha sido estudiado en larvas de varias especies de peces de interés comercial: *Cyprinus carpio carpio* Linnaeus 1758, *Salmo salar* Linnaeus 1758, *Paralichthys californicus* Ayres 1859, *Acipenser medirostris* Ayres 1854 (Fuiman 1983; Gisbert *et al.* 2002; Gisbert y Doroshov 2006), teniendo como hipótesis que el modelo de crecimiento refleja las prioridades en las funciones vitales del pez. La cabrilla sardinera, en su ontogenia temprana, presenta cambios en la tasa de crecimiento de sus proporciones corporales; durante el desarrollo larvario, en las estructuras analizadas se observan dos fases de crecimiento bien marcadas. La primera fase ocurre, desde que las larvas eclosionan hasta que alcanzan una longitud total < 17.37 mm, que corresponde a larvas entre los 1 y 35 DPE, el crecimiento es negativo en la altura y longitud de la cabeza, longitud del tronco, altura y longitud de la cola en relación a la longitud total de las larvas. El crecimiento es negativo, también en la relación del diámetro del ojo vs la longitud total de las larvas. Esta relación es válida desde la aparición de los ojos hasta que los organismos alcanzan una longitud total < 20.13 mm, que corresponde a larvas entre los 1 y 40 DPE. Posteriormente, en todas las estructuras analizadas, el crecimiento alométrico es positivo hasta finalizar la metamorfosis. Este tipo de crecimiento se puede asociar a los distintos nichos que ocupa la especie en esta etapa de su desarrollo en condiciones naturales; primero es una larva pelágica cuya prioridad es alcanzar una mayor talla (L_t) y sus necesidades biológicas de (alimentación, locomoción, respiración) las cubre siendo un organismo con una actividad moderada en la columna de agua y un depredador de oportunidad. Posteriormente, la larva se asienta en zonas de sargazo, que son una fuente importante de protección donde existe un porcentaje mínimo de depredación (Jenkins *et al.* 1997); en esta segunda fase del desarrollo larval se observa un incremento en el tamaño de las estructuras que preparan las

larvas para su etapa de asentamiento en las zonas de sargazo donde se convierten en predadores más activos. La secuencia de estos eventos concuerda con lo observado en el desarrollo estructural de las larvas de cabrilla sardinera, que presentan un mayor desarrollo de las estructuras analizadas, mediante las técnicas de crecimiento alométrico, cuando las larvas alcanzan una longitud total >17.37 mm que corresponde a un organismo entre los 30 y 35 DPE. En este punto se observa el desarrollo de todas las aletas y comienza la disminución de las espinas dorsal y pélvicas, y el tamaño de la boca y el diámetro de los ojos se incrementa, favoreciendo la capacidades de depredación. También se observa incremento en la longitud y altura de la cabeza que determina el desarrollo de las branquias para una mejor respiración; el incremento en la longitud del tronco y la altura de la cola son un reflejo del aumento del tamaño del sistema digestivo. Al igual que en la cabrilla sardinera el rápido desarrollo de ciertas estructuras que facilitan la alimentación es común en larvas pelágicas (Kitajima *et al.* 1991; Gisbert *et al.* 2002; Jagadis *et al.* 2006). Es en esta segunda etapa del cultivo larval es donde se puede realizar un ajuste en las prácticas de alimentación, ya que los requerimientos alimenticios de las larvas se incrementan favoreciendo un rápido crecimiento y una disminución en el tiempo del cultivo larvario.

7.2 Evaluación bioquímica de la capacidad digestiva

El conocimiento detallado de la fisiología digestiva a lo largo del desarrollo larvario en las especies de peces con potencial de cultivo resulta fundamental en la producción de alevines, ya que el nivel de actividad de algunas enzimas puede ser utilizado como indicador del status nutricional de las larvas (Ueberschär 1993) y en la elaboración de los protocolos de alimentación basados en el conocimiento de las capacidades digestivas de las larvas en cada estadio de desarrollo (Zambonino y Cahu 1994; Martínez *et al.* 1999).

En el presente trabajo se detectó la actividad de las proteasas alcalinas tripsina y quimotripsina, en la etapa embrionaria de la cabrilla sardinera, 4 horas antes de la eclosión. Esto nos confirma que la producción de estas enzimas es un evento genéticamente programado y que el páncreas ya está desarrollado antes de la eclosión con sus células acinares funcionales, produciendo y secretando estas enzimas proteolíticas que intervienen en la ruptura del corion (Civera-Cerecedo *et al.* 2004). Otros autores reportan la presencia de estas enzimas en larvas previo a la apertura de la boca y en organismos mantenidos en ayuno en los mismos periodos (Cahu y Zambonino 2001, Álvarez *et al.* 2006, Zouiten *et al.* 2008). El ligero incremento de la actividad de la tripsina en el 3 DPE se puede asociar a la apertura de la boca en las larvas, tiempo en el cual se da la primera alimentación (Ribeiro *et al.* 1999, Lazo *et al.* 2000, Alvarez-González *et al.* 2006). El incremento abrupto de la actividad enzimática observado hasta el 7 DPE con larvas en el punto de no retorno, posiblemente se deba a la utilización de la gluconeogénesis como vía metabólica alterna y como último recurso de las larvas para sobrevivir en inanición. Esto se asocia a la pérdida de peso en las larvas mantenidas en ayuno, sin embargo la secreción de enzimas se mantiene. La gluconeogénesis es un indicio de los procesos catabólicos que se están dando fuera del tubo digestivo, particularmente en el hígado. Se ha observado que el incremento de tripsina puede estar relacionado con un mayor desarrollo en la actividad exocrina del páncreas en este periodo del desarrollo larval donde se correlaciona con un mayor crecimiento (Gisbert *et al.* 2004). En el presente trabajo no se detectaron diferencias significativas en la actividad enzimática de las larvas mantenidas en ayuno y las larvas alimentadas en los primeros 7 días posteriores a la eclosión, posiblemente por el bajo porcentaje de larvas que lograron realizar la primera alimentación de forma exitosa.

Hussain y Higuchi (1980), Kohno *et al.* (1997) y Gracia-López *et al.* (2005) reportan una supervivencia larval menor al 2 % en un cultivo debido a este problema, y por esta razón es posible que no pudiéramos detectar diferencias cuantitativas entre los dos grupos de larvas analizadas

En general, el patrón de la actividad de la amilasa es similar a lo reportado por otros autores (Moyano *et al.* 1996, Martínez *et al.* 1999) siendo elevada en los primeros días después de la eclosión y disminuyendo gradualmente conforme se desarrollan las larvas mantenidas en inanición; en el presente trabajo, se detectó de forma temprana, a partir del 1 DPE e incrementa la actividad de esta enzima de forma continua hasta alcanzar su punto máximo en el 4 DPE, por lo que creemos que en este punto se relaciona con la apertura de la boca. Las larvas mantenidas en ayuno disminuyen su actividad amilasa a partir del 5 DPE y a partir del 6 DPE no se detecta ninguna actividad, asociando a que probablemente las larvas entran en el punto de no retorno. En las larvas alimentadas, se mantiene una actividad similar durante los primeros días de vida, para después incrementar significativamente a partir de los 30 DPE coincidiendo con el inicio del destete. El incremento en la actividad amilasa entre los 30 y 40 DPE está probablemente ligado al contenido de carbohidratos de la dieta lo cual ha sido observado previamente por Henning *et al.* (1994), Péres *et al.* (1998), Cara *et al.* (2002) y Zouiten *et al.* (2008) y estas biomoléculas están presentes en la dieta inerte utilizada en nuestro experimento (Bernaqua, caviar) ya que utilizan levaduras como parte de sus ingredientes. También es importante mencionar que la actividad de la amilasa puede variar dependiendo el nivel trófico del pez al concluir su metamorfosis, así como en los peces herbívoros y omnívoros donde se

observan mayor actividad de amilasa que los peces carnívoros desde los primeros días de vida como en la lisa gris *Chelon labrosus* Risso, 1827 (Zouiten *et al.* 2008) y la carpa común *Cyprinus carpio* Linnaeus, 1758 (Rathore *et al.* 2005).

En peces marinos, dependiendo de la especie, los lípidos pueden representar la mayor parte de sus reservas energéticas (Sargent 1995, Rainuzzo *et al.* 1997) durante los primeros días del desarrollo, por lo que la actividad lipasa es esencial para su buen aprovechamiento. En el presente trabajo, se detectó la actividad de la lipasa a partir del 1 DPE. En esta etapa es importante la actividad de esta enzima para poder catabolizar las reservas de lípidos del vitelo y de esta forma poder desarrollar las estructuras anatómicas necesarias para llevar a cabo la primera alimentación. Posteriormente, se observó un incremento de actividad hasta alcanzar su pico máximo en el 6 DPE. Nuestros resultados concuerdan con los reportados para *Sciaenops ocellatus* (Holt *et al.* 1991) y *Paralichthys californicus* (Alvarez-González *et al.* 2006) a quienes se les atribuye una alta capacidad en la absorción de lípidos en los estadios tempranos de desarrollo. A diferencia de las especies citadas anteriormente, en el presente trabajo no se observan incrementos significativos en la actividad de esta enzima, hasta comenzado el destete a los 30 DPE, lo que nos indica que la actividad de esta enzima puede estar fuertemente influenciada por el tipo de dieta. Además, es en este momento cuando se observa un mayor crecimiento de las larvas. Morais *et al.* (2004) reportan que la actividad de esta enzima en larvas de *Dicentrarchus labrax*, se ve altamente influenciada por el tipo de lípidos que contiene la dieta más que por su cantidad, ya que la respuesta de la lipasa está modulada principalmente por el efecto de la composición específica de ácidos grasos en la dieta.

Contrario a lo esperado, al cuantificar la actividad de las proteasas ácidas digestivas se observó una actividad muy temprana en los organismos. Esta actividad fue similar a la observada con las proteasas alcalinas analizadas (tripsina y quimotripsina), sin embargo lo más probable es que no sea pepsina gástrica sino alguna otra enzima ácida, como alguna de las catepsinas, que son enzimas proteolíticas lisosomales del tipo aspártico (EC 3.4.23.5) y pertenecen a la familia de las pepsinas. En el caso de las larvas mantenidas en inanición, estas enzimas podrían estar participando en la degradación del tracto intestinal y glándulas asociadas de las larvas (Chen *et al.* 2007), así como en procesos digestivos intracelulares, procesos de autólisis y la digestión o muerte de células como parte del proceso morfogenético normal del desarrollo (Mathews y van Holde 1998). En este trabajo, se detectó una baja actividad de la proteasa ácida hasta los 40 días de cultivo, a pesar de que en otros trabajos, esta misma enzima es detectada a los 18 DPE con el *P. californicus* (Alvarez *et al.* 2006), mientras que Feng *et al.* (2008) detecta actividad del tipo pepsina desde la eclosión de larvas de *Epinephelus coioides* usando la misma técnica que este trabajo. Sin embargo, como mencionamos anteriormente otras proteasas ácidas podrían estar enmascarando la actividad del tipo pepsina, como la catepsina D, ya que el pepsinógeno solo ha sido detectado por técnicas moleculares hasta el día 30 en *Pagrus pagrus* (Darías *et al.* 2007) y en el día 41 en *Epinephelus coioides* (Feng *et al.* 2008). En otros trabajos también, se detectó la actividad de la pepsina en larvas con un proceso avanzado de metamorfosis, cuando se forman las glándulas gástricas y un estómago funcional (Zacarias *et al.* 2006; Lazo *et al.* 2007). Zambonino y Cahu (2001) ya habían reportado que en las larvas de los peces marinos no se ha detectado la pepsina en los primeros días de vida, porque las larvas carecen de estómago en esta etapa y las glándulas

secretoras de HCl no son funcionales (Govoni *et al.* 1986). Por todo esto, se recomienda en trabajos futuros, en la medida que el tamaño de las larvas lo permita, realizar la disección del sistema digestivo para producir los extractos enzimáticos solo de enzimas digestivas y así poder identificar adecuadamente el momento en que se expresa la actividad de la pepsina como indicador de un estómago funcional. Así mismo, es importante corroborar la actividad de la pepsina con técnicas electroforéticas, moleculares e histológicas que demuestren la formación de las glándulas gástricas.

En los peces, las catepsinas se localizan en el bazo, el hígado y en los músculos (Siebert 1958; McLay 1980; Bonete *et al.* 1984); tomando en cuenta estos antecedentes podemos explicar la actividad detectada de forma temprana en los huevos embrionados hasta el 3 DPE ya que en este periodo se aprovechan las reservas de vitelo del huevo en un proceso de catabolismo de las proteínas presentes en el mismo; este proceso se da en ausencia de alimento exógeno ya que es en el 3 DPE que se da la apertura de la boca en las larvas. Se aprecia un descenso de la actividad hasta el 5 DPE que nos indica el punto de no retorno y el fin de los recursos endógenos de las larvas. A partir de este punto, las larvas en ayuno entran en un proceso de autólisis comenzando por la degradación del músculo esquelético y cardíaco; siendo posiblemente las razones de la detección de las catepsinas la digestión intracelular que se estaba dando en este periodo aunado a la técnica de maceración de larvas completas utilizada en nuestro ensayo. Posteriormente en las larvas alimentadas no se observan incrementos significativos en la actividad específica de las proteasas ácidas por lo que podemos deducir que las larvas aún no tienen un estómago funcional a los 40 DPE, aunque en la actividad individual se observa el incremento de esta

enzima con el tiempo. Estos resultados junto con la baja actividad de las proteasas ácidas detectadas, nos confirman un desarrollo tardío del estómago funcional en esta especie.

El proceso de maduración de la membrana con el borde del cepillo, se reafirma claramente por el patrón de la actividad de varias de las enzimas analizadas. El incremento de la actividad de la fosfatasa alcalina en las larvas mantenidas en ayuno está relacionado con la absorción del saco de vitelo ya que la actividad de esta enzima se detecta en los primeros días de vida de las larvas. La actividad incrementa gradualmente a medida que disminuyen las reservas de vitelo, y la actividad disminuye cuando las reservas en el saco de vitelo se han agotado. En las larvas alimentadas se observa el primer incremento significativo a partir de los 3 DPE esta actividad la asociamos a la apertura de la boca y posterior mente se observa incrementos significativos a partir del 10 DPE, asociados a la demanda de calcio para la formación de estructuras óseas en las larvas ya que la fosfatasa alcalina se relaciona directamente con el transporte de iones; esta actividad se genera en los enterocitos en el borde del cepillo (Ribero *et al.* 1999).

La disminución de la digestión intracelular (i.e., leu-ala peptidasa) y la maduración de la membrana con borde de cepillo de los enterocitos (i.e., aminopeptidasa, fosfatasa alcalina) marca el patrón de digestión como los adultos de la especie (Cahu *et al.* 1998; Ribero *et al.* 1999). En el presente estudio, el patrón de la actividad de la aminopeptidasa tiene un comportamiento similar al de la fosfatasa alcalina; por el contrario, la disminución de la actividad de la enzima, leucina alanina peptidasa, nos indica una disminución de la digestión intracelular en los organismos a partir de la cuarta semana de vida, observado en otras especies Zambonino-Infante y Cahu (2001). Cara *et al.* (2004) proponen el uso del

cociente de la actividad de la fosfatasa ácida y la leucina peptidasa, dado que la primera se ha identificado en procesos tempranos de pinocitosis (i.e., digestión intracelular) y la segunda caracteriza la digestión en la membrana de los enterocitos (digestión extracelular).

El patrón de actividad de la maltasa durante el período de ayuno, mostró variaciones al día 7 de la eclosión, ocasionado por la falta de alimento y por el consumo de las reservas de glucógeno para compensar la alta tasa metabólica que caracteriza a los peces durante el período larvario. Margulies (1993) menciona que durante el período larvario, los peces son más vulnerables a los períodos de ayuno, ocasionando daños epiteliales en el tracto digestivo, lo que reduce la ingesta de alimento y su absorción (Chen *et al.*, 2007). Por el contrario, las larvas alimentadas muestran un aumento de actividad durante su crecimiento hasta alcanzar el establecimiento de los enterocitos bien desarrollados, lo que caracteriza una maduración digestiva observada en diversas especies como en el dentex común *D. dentex* (Gisbert *et al.* 2009), *D. Labrax* (Cahu y Zambonino Infante 1995) y *S. Senegalensis* (Ribeiro *et al.* 1999).

Finalmente, podríamos considerar que esta especie presenta una actividad enzimática diversa y muy semejante a otros peces marinos ya estudiados, cuyo conocimiento puede ser aprovechado para diseñar dietas y protocolos acordes a las diferentes etapas de su desarrollo. Con base en los resultados obtenidos en el presente estudio, se considera que las larvas de la cabrilla sardinera poseen un sistema digestivo parcialmente funcional, específicamente las glándulas del páncreas y el hígado, antes del inicio de la alimentación exógena y que su capacidad digestiva se incrementa gradualmente conforme se desarrollan. El incremento significativo en la actividad de la tripsina, lipasa y

amilasa entre los 30 y 40 DPE, sugiere que las larvas son capaces de soportar adecuadamente el destete en este período; si los cultivos larvarios se realizan a una temperatura de entre los 25 y 26 °C.

7.3 Histología del sistema digestivo en las larvas de cabrilla sardinera

Al desarrollar el presente trabajo, se observó que la cabrilla sardinera presenta un

desarrollo morfológico similar a la mayoría de las especies de peces marinos que poseen una ontogenia indirecta, que habitan en aguas tropicales, sub tropicales y que se trabajan actualmente en la acuicultura. Observamos que la diferenciación de la región bucofaringea, intestino y recto, se estableció entre los 3 y 4 DPE (Walford y Lam 1993; Calzada *et al.* 1998; Gisbert *et al.* 2004) y que el desarrollo de estas estructuras coincide con la primera alimentación. Sin embargo, el tiempo en el que pueden ocurrir estos cambios, depende en gran medida, de la temperatura en la que se desarrolla el cultivo. En esta etapa del desarrollo larvario la mayor parte de la digestión ocurre de forma intracelular por procesos de pinocitosis, esto lo podemos confirmar por la presencia de cuerpos supra nucleares acidófilos en el intestino de las larvas, siendo éste el principal mecanismo de absorción de proteínas en las larvas mientras no se desarrolla un estómago funcional (Govoni *et al.* 1986; Gisbert *et al.* 2004). Durante este periodo, el intestino anterior ha sido descrito como el principal sitio donde ocurre la digestión proteolítica extracelular en las larvas, en un medio

alcalino y en presencia de la tripsina. Esta enzima es secretada por el páncreas y en este trabajo fue detectada en el 1 DPE, antes de la alimentación exógena. Esto confirma la importancia de las secreciones pancreáticas durante el periodo gástrico en el desarrollo de las larvas como fueron reportados por Ribeiro *et al.* (1999), Gatesoupe *et al.*, (2001), y Gisbert *et al.* (2004).

La formación de los ciegos pilóricos indica uno de los mayores cambios en el sistema digestivo de las larvas de peces (Bisbal y Bengtson, 1995; HamLin *et al.*, 2000). Los ciegos pilóricos incrementan el área de la digestión y absorción, conforme incrementa el tamaño del intestino y se fortalecen las funciones intestinales, en la limitada cavidad abdominal (Buddington y Diamond, 1987; Chen *et al.* 2006). En este estudio se observaron en el intestino a partir de los 3 DPE las micro vellosidades que nos indican un área de absorción mayor que hace más eficiente la asimilación del alimento; éstas se incrementan a partir los 10 DPE; a diferencia de otros autores que reportan la aparición de estas microvellosidades a partir de los 7 DPE (Meza *et al.* 2002; Zambonino y Cahu 2001). En la cabrilla sardinera se hace mas notable el incremento de el área de absorción intestinal a partir de los 25 DPE, donde los ciegos pilóricos ya son notables, esto se confirma con el incremento de los pliegues primarios y secundarios en la parte media y posterior del intestino; en la parte anterior no se observan dichos pliegues, sino solamente un ensanchamiento del intestino donde se formará el estómago.

Las células caliciformes encargadas de la producción de mucus para la lubricación de la primer sección del tubo digestivo, se observan en el 10 DPE en la zona bucofaríngea y esófago específicamente, algo similar a lo observado en el Turbot *Scophthalmus maximus* (Cousin y Baudin-Laurencin 1985) y en el lenguado de California *Paralichthys californicus*

(Gisbert *et al.* 2004). En otras especies los autores reportan la aparición de este tipo de células asociadas a la primera alimentación exógena como en los peces planos *Solea solea* (Boulhic y Gabaudan, 1992), *Pleuronectes ferruginea* (Baglolle *et al.* 1997) y lenguado de Senegal *Senegal sole* (Ribeiro *et al.* 1999). También se asocian las secreciones de las células caliciformes con un rol de protección, por la presencia de ácido sálico, que previene virus y bacterias (Hirji y Courtney 1983; Scocco *et al.* 1998; Zimmer *et al.* 1992). Este punto es importante ya que en las prácticas habituales de alimentación se proporcionan rotíferos enriquecidos mediante emulsiones lipídicas a partir de la primera alimentación lo que aporta una fuerte carga bacteriana al cultivo (Pérez-Benavente y Gatesoupe 1998; Gatesoupe 1990). Tendría que demostrarse si esto puede ser causa de mortalidad en la cabrilla sardinera, ya que esta no presenta la protección de la mucosidad secretada por las células caliciformes en el momento de la primera alimentación. Este problema se puede solucionar enriqueciendo los rotíferos únicamente con microalgas. Para este proceso se recomiendan las especies *Isochrhysis galbana* y *Chaetoceros calcitrans* lo que ha reducido las mortalidades de forma significativa en otras especies (Conklin *et al.* 2003).

Las vacuolas supranucleares en el intestino son un signo de digestión intracelular y pinocitosis de proteínas antes de la aparición de las glándulas gástricas (Watanabe 1984; Calzada *et al.* 1998; HamLin *et al.* 2000); en la cabrilla sardinera se detectaron por primera vez a partir del 10 DPE y su número máximo se observa a los 25 DPE y posteriormente decrecen antes de la aparición de las glándulas gástricas a los 40 DPE. Estos resultados son similares a los reportados para el lenguado de california *Paralichthys californicus* (Gisbert *et al.* 2004); En otras especies de crecimiento mas rápido, como el dentex común *Dentex dentex*, el número de vacuolas supranucleares en el intestino posterior alcanza su máximo a

los 11 DPE y desaparecen a los 18 DPE cuando las glándulas gástricas se forman (Santamaría *et al.* 2004); esto nos indica que el mecanismo de digestión de proteínas cambia de la pinocitosis y digestión intracelular por digestión extracelular en el momento en que las glándulas gástricas producen las enzimas.

La aparición de las glándulas gástricas indica la formación del estómago funcional (Stroband y Kroon 1981). Esta característica morfológica ha sido utilizada para diferenciar entre el estadio de larva y juvenil en los peces marinos que presentan una ontogenia indirecta (Tanaka 1971; Sarasquete *et al.* 1995). La larva con estómago funcional tiene la capacidad de catabolizar proteínas a aminoácidos libres, por la acción de la pepsina y ácidos presentes, lo que amplía el espectro de alimentos posibles para los peces (Senger *et al.* 1994). Si bien es cierto que las glándulas gástricas incrementan la eficiencia digestiva, trabajan de forma coordinadamente con otras glándulas que participan en los procesos digestivos como el páncreas y el hígado. En especies que se consideran de lento crecimiento, las glándulas gástricas aparecen después de los 30 DPE, como en el pez plano *Pleuronectes ferruginea* donde se detectan a los 36 DPE (Baglole *et al.* 1997), a los 60 DPE en la dorada (Elbal *et al.* 2004); en otras especies que se consideran de crecimiento rápido las glándulas gástricas aparecen previo a los 30 DPE, como es el caso de *Dicentrarchus punctatus* donde se detectan a los 16 DPE (Peña *et al.* 2003); a los 11 DPE en el atún *Thunnus orientalis* (Kaji *et al.*, 1996) y a los 12 DPE en jurel *Seriola lalandi* (Umeda *et al.* 1987). En el presente trabajo se detectaron las glándulas gástricas hasta los 40 DPE esta característica morfológica ubica a la cabrilla sardinera como una especie de crecimiento lento.

7.4 Análisis del tipo y densidad de presas e intensidad de luz óptimos durante la primera alimentación

La supervivencia en los cultivos larvarios de los peces marinos puede variar dependiendo de la especie y el grado de avances que se tenga en el desarrollo de las técnicas de cultivo, se reportan valores desde 0.1 hasta más del 50% (Hempel 1979; Bass *et al.* 1992; Fokusho 1993; Álvarez-Lajonchere *et al.* 1994). Uno de los principales puntos estudiados en el desarrollo de tecnologías de cultivo de larvas de peces marinos es el efecto que pueden tener los factores físicos, químicos y biológicos, en la supervivencia y el crecimiento de las larvas. Dentro de los factores biológicos podemos mencionar: los factores nutricionales.

En este estudio, se evaluó la primera alimentación de las larvas de cabrilla sardinera, punto crítico en la vida de las larvas, ya que en esta etapa, punto el alimento exógeno es indispensable para la nutrición de los organismos al agotarse paulatinamente sus reservas endógenas proporcionadas por el vitelo.

Uno de los principales problemas en el cultivo de peces marinos es el tamaño de presa a proporcionar en la primera alimentación ya que muchas especies, y en especial las pertenecientes a la familia Serranidae a la que pertenece la cabrilla sardinera, presentan una boca muy pequeña (Hussain y Higuchi 1980; Kayano 1988). Esto limita a las larvas a tomar alimentos que presenten el tamaño superior al 50% del tamaño de la apertura de su boca (Shirota 1970; Hunter 1984).

A pesar de que los rotíferos proporcionados en el desarrollo de nuestro experimento fueron tamizados a 75 μ m y que las larvas de cabrilla sardinera tienen una apertura de boca

de 130 μm (Martínez-Lagos y Gracia-López 2009), la supervivencia obtenida en las larvas alimentadas únicamente con rotíferos, fue menor que la de las larvas alimentadas solamente con larvas trocóforas. Estos resultados se pueden atribuir a dos posibles causas: la primera es que los rotíferos continuaron creciendo en el medio después de ser proporcionados a las larvas, ya que su tamaño puede variar de 50 a 250 μm (Fukucho 1989) haciéndolos inaccesibles físicamente a las larvas en un tiempo relativamente corto dentro del cultivo, y la segunda razón podría contemplar que la distribución estadística normal es la más frecuente en la naturaleza (Daniel 2006), donde esta distribución se caracteriza por agrupar la mayor parte de la población de organismos en un tamaño intermedio y el resto de la población en los extremos, los organismos más pequeños y los más grandes por lo que es posible que los rotíferos solo sean accesibles como alimento para un número reducido de organismos dentro de la población de larvas, las de mayor tamaño.

Asimismo podemos mencionar que se encontraron diferencias en la supervivencia de las larvas alimentadas solo con larvas trocóforas y las larvas alimentadas con la mezcla de rotíferos y trocóforas; en este último grupo se observó una menor supervivencia. La posible causa de esta diferencia, se la atribuimos al tiempo de permanencia del alimento en los tanques de cultivo, ya que las mallas del tamiz de salida de agua hacia el drenaje fueron de 300 μm en los tanques con larvas alimentadas con la mezcla de presas pero de 50 μm en los tanques con larvas alimentadas únicamente con larvas trocóforas. La razón de la diferencia del tamaño de mallas fue la de permitir la salida de rotíferos y trocóforas con el recambio y no saturar el cultivo con alimento vivo e incrementar los niveles de amonio que podrían generar mortalidades (Tuker 1998; Álvarez-lajonchere y Hernández-molejón 2001). Este evento nos permite suponer que el tiempo de permanencia de las presas en el

cultivo es importante ya que las larvas alimentadas solamente con larvas trocóforas tenían mallas de 50 μm donde posiblemente la salida de las presas del cultivo fue menor, ya que el tamaño de las larvas trocóforas proporcionadas en el experimento fue de entre 40 y 50 μm . Esta mayor supervivencia, nos confirma que son un alimento más accesible para las larvas de cabrilla sardinera que los rotíferos tamizados. Aunque utilizando solamente rotíferos tamizados es posible obtener larvas de cabrilla sardinera, la supervivencia es menor a la que obtendríamos si usáramos otros alimentos de menor tamaño y buena calidad nutricional, como las larvas trocóforas de ostión. Este tipo de alimento ya se ha utilizado con éxito en otras especies de meros de la familia Serranidae (Lin *et al.* 1986; Kitajima *et al.* 1991) lo que confirma nuestros resultados.

Al analizar el experimento realizado con distintas densidades de presa, podemos confirmar que la disponibilidad de presas es importante para el cultivo larvario de la cabrilla sardinera y que un mayor número de presas incrementa la supervivencia en los primeros días de vida, ya que las larvas de esta especie son predadores de oportunidad y tienen una pobre capacidad de natación en los primeros días de vida (Martínez-Lagos y Gracia-López 2009); esto también ha sido demostrado en otras especies como el fletán *Hippoglossus hippoglossus*. (Gulbrandsen 1991b), la dorada *Sparus aurata* (Parra y Yúfera 2000) y la cabrilla arenera *Paralabrax maculatofasciatus* (Peña *et al.* 2005b). De esta forma, se supone que una alta densidad de presas reduce el tiempo de búsqueda de las larvas y facilita el proceso de alimentación (Hart 1997). Aunque lo anterior lo podemos confirmar con nuestros resultados, también es importante mencionar que un exceso de presas puede ocasionar un aumento considerable de la concentración de amonio y rebasar los límites de tolerancia recomendados para las larvas (Tucker 1998). Este efecto se

observó en nuestro experimento en las larvas alimentadas con el mayor número de presas. Este problema puede solucionarse con una mayor tasa de recambio de agua en los cultivos. Sin embargo, hay que tener presente que las larvas de peces marinos son muy frágiles en los primeros días de vida y un recambio fuerte también podría causar altas mortalidades.

En el tercer experimento, se observó una mayor supervivencia en las larvas sometidas a una mayor intensidad de luz, lo que nos indica que este parámetro favorece el proceso de alimentación en la cabrilla sardinera, estimulando a la larva en su acción predatoria, ya que la selección, localización y ataque a las presas depende mucho de la intensidad de la luz (Downing y Litvak 1999; Peña *et al.* 2005b) favoreciendo el desarrollo de los ojos, especialmente en las larvas pelágicas de peces tropicales. Las larvas de algunos peces de zonas templadas presentan mejor supervivencia y desarrollo a intensidades de luz baja y fotoperiodos combinados de luz y oscuridad (Bolla y Holmefjord 1988; Skiftesvik 1994). De esta forma, las larvas de *Dentex dentex* presentan un mejor desarrollo y supervivencia en oscuridad total (Firat *et al.* 2003; Shiri *et al.* 2004) adjudican esto a un menor estrés. En especies de zonas tropicales las larvas se ven favorecidas por una mayor intensidad de luz como en el caso de *Epinephelus coioides* (Toledo *et al.* 2002) y *Paralabrax maculatofasciatus* (Peña *et al.* 2004) o incluso en especies dulce acuícolas como el bagre *Heterobranchus longifilis* (Nwosu y Holzlöhner 2000). Lo anterior tiene una razón lógica asociada al nicho ecológico de las larvas pelágicas en las zonas tropicales de aguas claras, donde el estímulo de la alimentación es visual a intensidades de luz muy altas. Además, posiblemente la mejor supervivencia en nuestro tercer experimento se vio incrementada por el efecto de la sinergia del conocimiento adquirido en los dos

experimentos anteriores, pues proporcionamos una presa accesible para las larvas y las cantidades adecuadas.

En los tres experimentos realizados no se encontraron diferencias en el crecimiento de las larvas, posiblemente por que son de crecimiento lento (Martínez-Lagos y Gracia-López 2009) y en los primeros días de vida la energía de las larvas se orienta al desarrollo de estructuras que favorezcan el proceso de alimentación como el intestino, las glándulas secretoras de enzimas (Firat *et al.* 2003) y otras estructuras que faciliten la alimentación como los ojos o estructuras óseas de la boca (Kohno *et al.* 1997; Peña *et al.* 2004).

8 Conclusiones

De acuerdo con los resultados obtenidos se acepta la primera hipótesis planteada ya que, el conocimiento de la ontogenia morfológica permite mejorar las prácticas que se realizan en la actualidad en los cultivos larvarios de la cabrilla sardinera. La segunda hipótesis se puede aceptar parcialmente ya que no se observaron diferencias en el crecimiento de las larvas en los distintos tratamientos realizados y con base a ello se llegó a las siguientes conclusiones:

1. La cabrilla sardinera, presenta en su desarrollo las fases típicas del desarrollo larvario de los miembros de la familia *Serranidae*. Se observó la fase de saco vitelino desde el día de la eclosión hasta el cuarto día de vida, la fase de la preflexión desde el quinto a los 25 DPE y la fase de flexión de los 26 hasta los 60 DPE a una temperatura de 25°C. A partir de este momento todos los organismos en el cultivo han alcanzado la etapa de pez juvenil.
2. Durante el desarrollo larvario de la cabrilla sardinera es notable el desarrollo de las siguientes estructuras: los ojos pigmentados aparecen al segundo DPE, la apertura de la boca se da entre el tercer y cuarto DPE, las aletas pélvicas aparecen al cuarto DPE, las espinas extendidas de las aletas pélvicas y dorsal aparecen a los 10 DPE, el notocordio se flexiona a los 25 DPE, las aletas se forman en su totalidad entre los 30 y 35 DPE, comienza la aparición de escamas pigmentadas a los 40 DPE y desaparecen las espinas extendidas de la aleta dorsal y pélvicas entre los 40 y 55 DPE.
3. La cabrilla sardinera posee parte de su sistema digestivo funcional antes del inicio de la alimentación exógena, específicamente el páncreas y el hígado, morfológicamente las células caliciformes se observan en el tracto digestivo a los

10 DPE; el tracto digestivo se diferencia claramente a los 25 DPE, donde podemos observar el intestino anterior (sección bucofaríngea y esófago), el intestino medio donde se observan los ciegos pilóricos y el intestino posterior, donde disminuyen los pliegues intestinales primarios y secundarios hasta llegar al ano.

4. El estómago de las larvas de cabrilla sardinera es funcional de forma tardía hasta los 40 DPE.
5. Dada la disminución de actividad de las enzimas tripsina, quimotripsina, amilasa y maltasa al quinto DPE en las larvas de cabrilla sardinera cultivadas a 25°C, éstas llegan al punto de no retorno a partir del 5 día posterior a la eclosión.
6. El incremento significativo en la actividad de la tripsina, lipasa y amilasa entre los 30 y 40 días posteriores a la eclosión, nos hace pensar que las larvas son capaces de resistir el destete en este periodo.
7. La cantidad óptima de presas para la realización de una primera alimentación efectiva en las larvas de cabrilla sardinera es de 18 a 20 trocóforas por mililitro que se deben suministrar entre el tercer y séptimo días posteriores a la eclosión.
8. Los cultivos larvarios de cabrilla sardinera se deben realizar con una iluminación mínima de 1000 lux.

9 Recomendaciones

1. De acuerdo con los cambios morfológicos de esta especie durante su desarrollo larvario y con el propósito de minimizar el tiempo en los cultivos larvarios de la cabrilla sardinera, el mejor momento para incrementar la temperatura en el cultivo es a partir de los 30 días posteriores a la eclosión.
2. De acuerdo a las características de las larvas de cabrilla sardinera, la densidad de presas deberá ser alta, o sea entre 8 y 15 presas por mililitro hasta los 25 días de vida de las larvas para facilitar la localización y captura de las presas por las larvas. Las presas pueden ser larvas trocóforas de los 3 a 7 DPE, rotíferos de los 8 a los 30 DPE y nauplios de *Artemia* de los 16 a los 35 DPE.
3. Debido al rápido crecimiento de la boca y al incremento de la capacidad digestiva de las larvas entre el momento de la flexión a los 25 DPE y el destete de las larvas a los 30 DPE; se recomienda omitir el uso de metanauplios y adultos de *Artemia* en los cultivos de cabrilla sardinera.
4. Se recomienda el uso de las microalgas *Isochrhysis galbana* y *Chaetoceros calcitrans* para el enriquecimiento de los rotíferos que se proporcionará a las larvas de cabrilla sardinera durante los primeros 10 días de vida, ya que esto podría evitar mortalidades por infecciones bacterianas en los primeros días de vida; debido a que las larvas no poseen células caliciformes que brindan protección en el tracto digestivo hasta edad.
5. Dado el pequeño tamaño de la boca de las larvas de cabrilla sardinera en el momento de la primera alimentación, el rotífero *Brachionus plicatilis* no es el alimento más apropiado para las larvas cabrilla sardinera en los primero 7 días de

vida. Preferente mente debe de ser sustituido por alimentos alternativos como las larvas trocóforas de ostión *Cassostrea gigas* o copepoditos de un tamaño $< 60\mu\text{m}$.

6. Dado la desaparición de las espinas extendidas de las aletas dorsal y pélvicas, las actividades de manejo para evitar el canibalismo en las larvas de cabrilla sardinera deben comenzarse entre los 40 y 50 días de cultivo.
7. Como complemento a este trabajo y para un mejor desarrollo de la tecnología de cultivo de la cabrilla sardinera, se recomienda realizar estudios nutricionales en juveniles y adultos.

Bibliografía

- Abellán E. 2000. Culture of common dentex (*Dentex dentex* L.): present knowledge, problems and perspectives. *Cahiers Options Méditerranéennes* 47: 157-168.
- Akatsu S., Al-Abdul-Elah K.M., Teng S.K. 1983. Effects of salinity and water temperature on the survival and growth of brown spotted grouper larvae (*Epinephelus tuavina*, Serranidae). *J. World Maric. Soc.* 14: 624-635
- Allen G.R., Robertson D.R. 1998. Peces del Pacifico Oriental Tropical. P-111 CONABIO, Agrupación Sierra Madre y CEMEX. México 327 pp.
- Alessio G. 1974. Reproduzione artificiale di orata, *Sparus aurata* (L.) (Oteichthyes, Sparidae) 3o Produzione su vasta scala di fito e zooplankton per l' alimentazione delle larve e degli avannotti *Boll. Pesca Piscic. Idrobiol.* 29: 133-147.
- Álvarez-González C. A., Cervantes-Trujano M., Tovar-Ramírez D., Conklin D. E., Nolasco H., Gisbert E., Piedrahita R. 2006. Development of digestive enzymes in California halibut *Paralichthys californicus* larvae. *Fish Physiology and Biochemistry.* 31:83-93.
- Álvarez-Lajonchere L., Pérez L., Torres E., Hernández O.G. 1994. Producción de juveniles del patao *Eugerres brasilianus* (Pisces, Gerridae) en Santa Cruz del Sur, Camagüey. *Re. Cub. Invest. Pesq.* 18:25-27.
- Álvarez-Lajonchere L., Hernández-Molejón O.G. 2001. Producción de peces estuarinos para un centro en América Latina y El Caribe: Diseño, Operación y Tecnologías. The World Aquaculture Society, Baton Rouge, LA, 424 pp.
- Anson M. L. 1938. The estimation of pepsin, trypsin, papain and cathepsin with hemoglobin. *J. Gen. Physiol.* 22: 79-89.
- Archibal A. L. 1987. Comparison of the serum amylases of farm animals. *Biochem. Physiol.* 88B, 963-968.
- Ásgeirsson B., Bjarnasson J. B. 1991. Structural and kinetic properties of chymotrypsin from atlantic cod (*Gadus morhua*). Comparison with bovine chymotrypsin. *Comp. Biochem. Physiol.* 99: 327-335.
- Ásgeirsson B., Hartemink R., Chlebowski J. F. 1995. Alkaline phosphatase from atlantic cod (*Gadus morhua*). Kinetic and structural properties wich indicate adaptation to low temperatures. *Comp. Biochem. Physiol.* 110B, 315-329.
- Avilés-Quevedo. 1995. Biología y Cultivo de la Cabrilla Arenera (*Paralabrax maculatofasciatus*). Centro Regional de Investigación Pesquera La Paz, Agencia de Cooperación Internacional del Japón. 85 pp.

- Baglolle C. J., Murray H. M., Goff G. P., Wright G. M. 1997. Ontogeny of the digestive tract during larval development of yellowtail flounder: A light microscopic and mucous histochemical study. *Journal of Fish Biology*. 51: 120-134.
- Balon E. K. 1984. Reflections on some decisive events in the early life of fishes. *Trans. Am. Fish. Soc.* 113,178-185.
- Balon E. K. 1985. *Early life histories of fishes*. D R W. Junk publishers. Boston. USA. 280 pp.
- Bass P., Tamaru C. S., Lee C. S. 1992. The use of elevated temperatures to shorten the hatchery phase of striped mullet, *Mugil cephalus* larvae. In: *Aquaculture 92: Growing Toward the 21st Century*, Orlando, FL (USA), 21-25 May 1992, p. 36.
- Bendschneider K., Robinson J. 1952. A new spectrophotometric method for the determination of nitrite in sea-water. *J. Mar. Res.* 11: 87-96.
- Benoit H. P., Pepin P. 1999. Interaction of rearing temperature and maternal influence on egg development rates and larval size at hatch in yellowtail flounder (*Pleuronectes ferrugineus*). *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 56, 785-794.
- Behal F. J., Asserson B., Dawson F., Hardman J. 1965. A study of human tissue aminopeptidase components. *Arch. Biochem. Biophys.* 111, 335-344.
- Bernabé G. 1990. Rearing bass and gilthead. In: G. Bernabé (ed.), *Aquaculture*, Vol. 2. Ellis Horwood, New York, p. 647-686.
- Bessey O. A., Lowry S. H., Brock M. H. 1946. A method for the rapid determination of Alkaline Phosphatase with five cubic milliliters of serum. *J. Biol. Chem.* 164-321.
- Bisbal G. A., Bengtson D. A. 1995. Development of the digestive tract in larval summer flounder. *Journal of Fish Biology*. 47: 277-291.
- Bonete M. J., Manjon A, Llorca F, Iborra J. L. 1984. Acid proteinase activity in fish. 1. Comparative study of extraction of cathepsins B and D from *Mugil auratus*. *Comparative Biochemistry and Physiology*.78: 203-206.
- Blaxter J. H. S., Hunter J. R. 1982. The biology of the clupeoid fishes. *Adv. Mar. Biol.* 20: 1-223.
- Blaxter J. H. S. 1986. Development of sense organs and behaviour of teleost larvae with special reference to feeding and predator avoidance. *Trans. Am. Fish. Soc.* 115: 98-114.
- Bolla S. Holmefjord I. 1988. Effect of temperature and light on development of Atlantic halibut larvae. *Aquaculture*. 74: 355-358.

- Bradford M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantization of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 248-254.
- Brown C. L., Bern H.A. 1989. Thyroid hormones in early development with special reference to teleost fishes In: M. P. Schreibman y C.G. Scanes (eds.), *Development, Maturation, and Senescence of neuroendocrine Systems: A Comparative Approach*. Academic Press, San Diego, p 289-306.
- Brownell C. L. 1980. Water quality requirements for first-feeding in marine fish larvae. I. Ammonia, nitrite, and nitrate. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 44: 269-283.
- Boulhic M., Gabaudan J. 1992. Histological study of the organogenesis of the digestive system and swim bladder of the Dover sole, *Solea solea* (Linnaeus 1758). *Aquaculture*. 102: 373-396.
- Buddington R. K., Diamond J. M. 1987. Pyloric ceca of fish: A "new" absorptive organ. *American Journal of Physiology*. 252: G65-G76.
- Burke M. G., Kirk M. R., Macbeth N. A., Bevan D. J., Moccia R. D. 2005. Influence of Photoperiod and Feed Delivery on Growth and Survival of First-Feeding Arctic Char. *North American Journal of Aquaculture*. 67: 344-350.
- Canioni P., Julien R., Rathelot J., Sarda L. 1977. Pancreatic and microbial lipases: a comparison of the interaction of pancreatic colipase with lipases of various origins. *Lipids*, 12, 393-397.
- Cahu C. L., Infante J. L. 1994. Early weaning of sea bass (*Dicentrarchus labrax*) larvae with a compound diet: effect on digestive enzymes. *Comparative Biochemistry and Physiology*. 109: 213-222.
- Cahu C. L., Zambonino-Infante J. L. 1995. Maturation of the pancreatic and intestinal digestive functions in sea bass (*Dicentrarchus labrax*): Effect of weaning with different protein sources. *Fish Physiology and Biochemistry* 14: 431-437.
- Cahu C.L., Zambonino-Infante J., Peres A., Quazuguel P., Le Gall M. M. 1998. Algal addition in sea bass (*Dicentrarchus labrax*) larvae rearing: Effect on digestive enzymes. *Aquaculture*. 161: 479-489.
- Cahu C. L., Zambonino-Infante J. 2001. Substitution of live food by formulated diets in marine fish larvae. *Aquaculture*. 200: 161-180.
- Calzada A., Medina A., González De Canales M. L. 1998. Fine structure of the intestine development in cultured sea bream larvae. *Journal of Fish Biology*. 53: 340-365.

- Cara B., Moyano J., Fernández C., Yúfera M. 2002. Actividad de enzimas digestivas durante el desarrollo larvario del Sargo (*Diplodus sargus*). CIVA 2002. (<http://www.civa2002.org>), 110-121.
- Cara B., Moyano J., Zambonino L., Fauvel C. 2004. Actividad tripsina y quimotripsina como indicadores de condición larvaria: estudio de restricción alimentaria y calidad de puesta. CIVA. 2004. (<http://www.civa2004.org>), 547-556.
- Cisneros-Mata M., Montemayor-López G., Roman-Rodríguez M. 1995. Life history and conservation of *Totoaba macdonaldi*. Conservation Biology. 9: 806-814.
- Civera-Cerecedo R., Alvarez-Gonzalez C. A., Moyano-López F. J. 2004. Nutrición y alimentación de larvas de peces marinos. In: Cruz-Suárez L. E., Ricque-Marie D., Nieto-López M. G., Villarreal D., Scholz U., y González M. 2004. Avances en nutrición acuícola VII. Memorias del VII Simposio Internacional de Nutrición Acuícola. 16-19 de noviembre del 2004. Hermosillo, Sonora, México.
- Conklin., Douglas E., Piedrahita Raul H., Merino German E., Muguet Jean-Benoit., Bush Douglas E., Gisbert Enric., Rounds James., Cervantes-Trujano Margarita. 2003. Development of California halibut, *Paralichthys californicus*, culture. Journal of Applied Aquaculture. 14: 143-154.
- Cousin J. C. B., Laurencin F. B. 1985. Morphogenesis of the digestive system and swim bladder of the turbot, *Scophthalmus maximus* L. Aquaculture. 47: 305-319.
- Cousin J. C. B., Baudin-Laurencin F., Gabaudan J. 1987. Ontogeny of enzymatic activities in fed and fasting turbot, *Scophthalmus maximus* L. Journal of Fish Biology. 30: 15-33.
- Cunha I., Planas M. 1999. Optimal prey size for early rodaballo larvae *Scophthalmus maximus* L. based on mouth and ingested prey size. Aquaculture. 175, 103-110.
- Curry E. 1939. The histology of the digestive tubes of the carp (*Cyprinus carpio communis*). Journal of morphology. 65: 53-78.
- Chen B. N., Qin J. G., Kumar M. S., Hutchinson W., Clarke S. 2006. Ontogenetic development of the digestive system in yellowtail kingfish *Seriola lalandi* larvae. Aquaculture. 256: 489-501.
- Chen B. A., Qin J. G., Carragher J. F., Clarke S. M., Kumar M. S., Hutchinson W. S. 2007. Deleterious effects of food restrictions in yellowtail kingfish *Seriola lalandi* during early development. Aquaculture. 271: 326-335.
- Daniel W. 2006. Bioestadística base para el análisis de las ciencias de la salud. LIMUSA. México. 755 pp.

- Darias M., Murray H., Gallant J., Douglas S., Yúfera M., Martínez-Rodríguez G. 2007. Ontogeny of pepsinogen and gastric proton pump expression in red porgy (*Pagrus pagrus*): Determination of stomach functionality. *Aquaculture* 270: 369-378.
- De La Parra Mia., Camacho J. L., Gonzalez-Rodriguez B., Martinez-Rodriguez I., Hernández C., García-Ortega A. 2006. A preliminary study on the effects of dietary protein level on growth and survival of juvenile bullseye puffer fish, *Sphoeroides annulatus*. *World Aquaculture*. 37: 34-38.
- Dhert P., Rombaut G., Suantika G., Sorgeloos P. 2001. Advancement of rotifer culture and manipulation techniques in Europe. *Aquaculture*. 200: 129-146.
- Díaz-Uribe J. G., Elorduy-Garay J. F., González-Valdovinos M. T. 2001. Age and Growth of the leopard grouper *Mycteroperca rosacea*, in the southern Gulf of California, Mexico. *Pac. Sci.* 55(2): 171-182.
- Dixon M., Webb E. 1979. *Enzymes*. 3a edición, Academic Press. New York.
- Doi M., Munir M. N., Nik Razali N. L., Zulkiffi T. 1991. Artificial Propagation of the Grouper, *Epinephelus suillus* at the marine finfish hatchery in Tanjong Demongu Terrengganu, Malaysia. *Kertas Pengembangan Perikanan*, (167), Department of Fisheries, Kuala Lumpur, Malaysia, 41 pp.
- Doi M., Toledo J. D., Golez M., De Los Santos M., Ohno A. 1997. Preliminary investigation of feeding performance of larvae of early red-spotted grouper, *Epinephelus coioides*, reared with mixed zooplankton. *Hydrobiología* 358, 259-263.
- Downing G., Litvak M. K. 1999. The effects of photoperiods, tanks colour and lighth intensity on growth of larvae haddock. *Aquaculture International*. 7: 369-382.
- Downing G., Litvak M. K. 2001. The effect of light intensity and spectrum on the incidence of first feeding by larval haddock. *Journal of Fish Biology*. 59: 1566-1578.
- Duarte C. M., Alcaraz M. 1989. To produce many small or few large eggs: a size-independent reproductive tactic of fish. *Oecologia* 80: 401-404.
- Dumermuth E., J. Bond, A. Flannery., R. Beynon. 1991. The astacin family of metalloendopeptidases. *J. Biol. Chem.* 266, 21831-21835.
- Duncan N., Garcia-Aguilar N., Rodriguez M. De O., G. Bernadet M; Martinez-Chavez C., Komar, C., Estanol P., Garcia-Gasca A. 2003. Reproductive biology of captive bullseye puffer (*Sphoeroides annulatus*), LHRHa induced spawning and egg quality. *Fish Physiology and Biochemistry*. 28: 505-506.

- Dupuis Y., S. Tardival Z. Poremska., P. Fournier. 1991. Effect of some alkaline phosphatase inhibitors of intestinal calcium transfer. *Int. J. Biochem.* 23, 175-180.
- Elbal M. T., Garcia Hernandez M. P., Lozano M. T., Agulleiro B. 2004. Development of the digestive tract of gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.). Light and electron microscopic studies. *Aquaculture*. 234: 215-238.
- Erisman Brad E., Buckhorn Michele L., Hastings Philip A. 2007. Spawning patterns in the leopard grouper, *Mycteroperca rosacea*, in comparison with other aggregating groupers. *Marine Biology*. 151: 1849-1861.
- Erisman B. E., Rosales-Casian J. A., Hastings P. A. 2008. Evidence of gonochorism in a grouper, *Mycteroperca rosacea*, from the Gulf of California, México. *Environmental biology of fishes*. 82: 23-33.
- Erlanger B., Kokowsky N., Cohen W. 1961. The preparation and properties of two new chromogenic substrates of trypsin. *Arch. Biochem. Biophys.* 95: 271-278.
- Estévez A., Planas M. 1987. Producción a gran escala de alevines de lobina (*Dicentrarchus labrax* L., 1758). *Inv. Tec. Inv. Pesq.* 139: 3-12.
- Evjemo J. O., Reitan K. I., Olsen Y. 2004. Copepods as live food organisms in the rearing of Atlantic halibut larvae (*Hippoglossus hippoglossus* L.) with special emphasis on nutritional value. *Aquaculture* 227: 191-211.
- FAO.2008. El estado mundial de la pesca y la acuicultura. Departamento de pesca y acuicultura FAO. 196 pp.
- Feng S., Li W., Lin H. 2008. Characterization and expression of the pepsinogen C gene and determination of pepsin-like enzyme activity from orange-spotted grouper (*Epinephelus coioides*). *Comparative Biochemistry and Physiology*. 149: 275-284.
- Fink W. L. 1981. Ontogeny and phylogeny of tooth attachment modes in actinopterygian fishes. *Journal of morphology*. 86: 377-380.
- Finn R. N., Fyhn H. J. 1995. Metabolic fuels in developing cod and turbot embryos and larvae. *ICES. Mar. Sci. Symp.* 201: 70-73.
- Firat K., Saka A., Coban D. 2003. The effect of light intensity on early life development of common dentex *Dentex dentex* (L. 1758) larvae. *Aquaculture Research*. 34: 727-732.
- Fuiman L. A. 1983. Growth gradients in fish larvae. *Journal of Fish Biology* 23, 117-123. 335.

- Fukuhara O. Fushimi T. 1988. Fin differentiation and squamation of artificially reared grouper, *Epinephelus akaara*. *Aquaculture* 69, 379-386.
- Fukusho K. 1989. Biology and mass production of rotifer *Brachionus plicatilis*. *Int. J. Aquac. Fish Technol.* 1, 232-240.
- Fukusho K. 1993. Mass larval rearing of finfish for sea ranching in Japan. In: D.S. Danielssen y E. Moksness (Editores), *International Symposium: Sea Ranching of Cod and Other Marine Species, Arendal (Norway), 15-18 jun 1993, Programs and abstracts*, p. 13.
- Fyhn H. J., Govoni J. J. 1995. Endogenous nutrient metabolization during egg and larval development in two marine fishes-Atlantic menhaden and spot. *ICES Mar. Sci. Symp.* 201: 64-69.
- Gatesoupe F-J. 1990. The continuous feeding of turbot larvae, *Scophthalmus maximus*, and control of the bacterial environment of rotifers. *Aquaculture*. 89: 139-148.
- Gatesoupe F. J; Zambonino Infante J. L; Cahu C; Bergot P. 2001. Ontogeny, development and digestive physiology of fish larvae. *Nutrition and feeding of fish and crustaceans*. pp. 197-211.
- Gemma G., Estevez A. 2008. Effect of larval and prey density, prey dose and light conditions on first feeding common dentex (*Dentex dentex* L.) larvae. *Aquaculture research*. 39: 77-84.
- Gisbert E., Merino G., Muguet J. B., Bush D., Piedrahita R. H., Conklin D. E. 2002. Morphological development and allometric growth patterns in hatchery-reared California halibut larvae. *Journal of Fish Biology* 61, 1217-1229.
- Gisbert E., Piedrahita R. H., Conklin D. E. 2004. Ontogenetic development of the digestive system in California halibut (*Paralichthys californicus*) with notes on feeding practices. *Aquaculture* 232 (1-4) 455-470.
- Gisbert E., Doroshov S. I. 2006. Allometric growth in green sturgeon larvae. *Journal of Applied Ichthyology* 22, 202-207.
- Gisbert E., Giménez G., Fernández I., Kotzamanis Y., Estévez A. 2009. Development of digestive enzymes in common dentex *Dentex dentex* during early ontogeny. *Aquaculture*. 287: 381-387.
- Giménez G., Estévez A. 2008. Effect of larval and prey density, prey dose and light conditions on first feeding common dentex (*Dentex dentex* L.) larvae. *Aquaculture research*. 39: 77-84.

- Glasser F., Oswald M. 2001. High stocking densities reduce *Oreochromis niloticus* yield : model building to aid the optimisation of production. *Aquat. Living Resour.* 14, 319-326.
- Gracia-López V., Rodríguez-Romero J., Pérez-Ramírez J. 2004a. Inducción del desove con HCG y desarrollo embrionario y de larvas de cabrilla sardinera, *Mycteroperca rosacea* (Streets, 1877). *Ciencias Marinas*: 30 (2): 279-284.
- Gracia-López V., Kiewek-Martínez M., Maldonado-García M. 2004b. Effects of temperature and salinity on artificially reproduced eggs and larvae of the leopard grouper *Mycteroperca rosacea*. *Aquaculture*: 237, 485-498.
- Gracia-López V., Kiewek-Martínez M., Maldonado-García M., Monsalvo-Spencer G., Portillo-Clark G., Civera-Cerecedo R., Linares-Aranda M., Robles-Mungaray M., Mazón-Suástegui M. 2005. Larvae and juvenile production of leopard grouper, *Mycteroperca rosacea* (Streets, 1877). *Aqua. Res.* 36, 110-112.
- Groman B. D. 1982. Histology of the striped bass. American fisheries society. Monograph number 3. Bethesda, Maryland, USA. 116 pp.
- Gómez-Rojo María E. 2007. Susceptibilidad de las fases iniciales de vida de la cabrilla sardinera *Mycteroperca rosacea* a la infección experimental por *Aeromonas hydrophila*. Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste. Tesis de maestría. 118 pp.
- Govoni J.J., G.W. Boehlert Y., Watanabe. 1986. The physiology of digestion in fish larvae. *Env. Biol. Fishes* 16: 59-77.
- Guerrero-Tortolero D. A., Muhlia-Melo A., Rodríguez-Romero J. 1999. Preliminary Study on the Effect of Stocking Density on the Growth and Survival of the Yellow Snapper *Lutjanus argentiventris* Confined in Cages in a Tidal Pond. *North American Journal of Aquaculture.* 61: 82-84.
- Gulbrandsen J. 1991. Effect of the light intensity on feeding success of the Atlantic halibut larvae. *Eur. Aquac. Soc. Spec. Pub.* 15, 336-338.
- Gulbrandsen J. 1991b. Functional response of Atlantic halibut larvae related to prey density and distribution. *Aquaculture.* 94: 89-98.
- Hagen N. 1993. Effect of different prey and larval densities on the gut content of plaice (*Pleuronectes platessa* L.) at initial feeding. In: Physiological and biochemical aspects of fish development. (Ed. by B.T. Walther & H. J. Fyhn). pp.180-182. Univ. Bergen. Norway.

- HamLin H. J., Hunt Von Herbing I., Kling, L. J. 2000. Histological and morphological evaluations of the digestive tract and associated organs of haddock throughout post-hatching ontogeny. *Journal of Fish Biology*. 57: 716-732.
- Harris H. 1989. The human alkaline phosphatases: what we know and what we don't know. *Clin. Chim. Acta* 186, 133-150.
- Hart P.J.B. 1997. Foraging tactics. In: *Behavioural Ecology of Teleost Fishes* (ed. By J.G.J. Godin), pp. 104-133. Oxford University Press, UK.
- Henning S. J., Rubin D. C., Shulman R. J. 1994. Ontogeny of the intestinal mucosa. In: Johnson LR. (Ed.) *Physiology of Gastrointestinal Tract*. Raven Press, New York, pp. 571-610.
- Heemstra P. C., Randall J. E. 1993. FAO, Species catalogue groupers of the world. (Family: Serranidae, Subfamily: Epinephelinae). *FAO fish Synops.*125 (16).
- Hempel G. 1979. Early life history of marine fish. Washington Sea Grant Publication, Seattle, (USA). 70 pp.
- Helvik J. V., Oppen-Berntsen D. O., Walther B. T. 1991. The hatching mechanism in Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*). *Int. J. Dev. Biol.* 35: 9-16.
- Hirikado M., K. Hirata Y., Uemarsu Y., Hatooka Y., Kazama M. 1994. Assay for activities of α -amylase and glucoamylase used in food processing. *J. Food Hyg. Soc. Japan*, 35, 28-33.
- Hirji K. N., Courtney W. A. M. 1985. Non-specific carboxylic esterase activity in the digestive tract of the perch, *Perca fluviatilis* L. *Journal of Fish Biology*. 22: 1-7.
- Hobson E. S. 1968. Predatory behavior of some shore fishes in Gulf of California. U. S. Fish Wildlife Service, Bureau Sport Fisheries. Wild. Resp. Rep. 73. 92. pp.
- Houde E. D., Schekter R. C. 1980. Feeding fish marine larvae: developmental and functional responses. *Env. Biol. Fish.* 5, 315-334.
- Holt G. J., Sun F., Lavens P., Sorgeloos P., Jaspers E., Ollevier F. 1991. Lipase activity and total lipid content during early development of red drum *Sciaenops ocellatus*. In: Lavens P, Sorgeloos P, Jaspers E, Ollevier F. (Eds.), *Larvi 1991. Fish and crustacean larviculture symposium. special publication 15. European Aquaculture Society, Gent*, pp. 30-33.
- Holt G. J. 1993. Feeding larval red drum on microparticulate diets in a closed recirculation water system. *J. World Aquacult. Soc.* 24: 225-230.

- Hseu J., Chang, H., Ting Y. 2003. Morphometric prediction of cannibalism in larviculture of orange-spotted grouper, *Epinephelus coioides*. *Aquaculture* 218, 203-207.
- Humason G. L. 1997. *Humason's Animal and Tissue Techniques*. The Johns Hopkins University Press, Baltimore, USA. 536 pp.
- Hunter J. R. 1980. The feeding behaviour and ecology of marine fish larvae. In: *Fish behaviour and its use in the capture and culture of fishes*. (Ed. by J. E. Bardach, J.J. Magnuson, R. C. May & J. M. Reinhart). pp.230-287. ICLARM conf. Proc.
- Hunter J. R. 1981. Feeding ecology and predation of marine fish larvae. In: *Marine fish larvae: Morphology, Ecology and Relation to Fisheries*. (Ed. by R. Lasker) pp 34-77. Washington Sea Grant Program, Seattle, USA.
- Hunter J. R. 1984. Synopsis of culture methods for marine fish larvae. *Am. Soc. Ichthyol. Herpetol. Spect. Pub.* 1, 24-27.
- Hussain N. A., Higuchi M. 1980. Larval rearing and development of the brown spotted grouper, *Epinephelus tauvina* (Forsk.) *Aquaculture*. 19: 339-350.
- Infante J. L., Cahu C. 1994. Development and response to a diet change of some digestive enzymes in sea bass (*Dicentrarchus labrax*) larvae. *Fish Physiology and Biochemistry*. 12: 399-408.
- Iwai T. R. 1980. Sensory anatomy and feeding of fish larvae. In: *Fish behaviour and its use in the capture and culture of fishes*. (Ed. by J.E. Bardach, J. J. Magnuson, R.C. May, J. M. Reinhart). pp. 124-145. ICLARM Conf. Proc.
- Izquierdo M. S., Socorro J., Arantzamendi L., Hernández-Cruz C.M. 2000. Recent advances in lipid nutrition in fish larvae. *Fish Biochem. Physiol.* 22: 97-107.
- Jagadis I., Ignatius B., Kandasami D., Khan Mdajmal. 2006. Embryonic and larval development of honeycomb grouper *Epinephelus merra* Bloch. *Aquaculture Research* 37, 1140-1145.
- James M. C., Al-Thobaiti A. A., Rasem B. M., Carlos M. H. 1998. Growout production of camouflage grouper, *Epinephelus polyphecadion* (Blaker), in tank culture system. *Aquac. Res.* 29: 381-388.
- Jenkins G. P., Black K. P., Wheatley M. J., Hatton D. N. 1997. Temporal and spatial variability in recruitment of a temperate, seagrass associated fish is largely determined by physical processes in the pre and post settlement phases. *Marine Ecology Progress Series* 148, 23-25.

- Kaji T., Tanaka M., Takahashi Y., Oka M., Ishibashi N. 1996. Preliminary Observations on Development of Pacific Bluefin Tuna *Thunnus thynnus* (Scombridae) Larvae Reared in the Laboratory, with Special Reference to the Digestive System. *Mar Freshw. Res.* 47: 261-269.
- Kayano Y. 1988. Development of mouth parts and feeding in the larval and juvenile stages of red spotted grouper *Epinephelus akaara*. *Bulletin of the Fisheries Experiment Station, Okayama Prefecture. Ushimado.* 3: 55-60.
- Kayano Y., Mito T. 1994. Mass production of seedlings of the red spotted grouper *Epinephelus akaara*. *Bulletin of the Fisheries Experiment Station Okayama Prefecture* 9, 175–179.
- Kendall Jr. A. W. 1984. Serranidae: development and relationships, p. 499-510. In: H.G. Moser, W.J. Richards, D.M. Cohen, M.P. Fahay, A.W. Kendall, Jr., and S L. Richardson (eds), *Ontogeny and Systematics of Fishes*. An international symposium dedicated to the memory of Elbert Halvor Ahlstrom held August 15–18 at La Jolla, California. *American Society of Ichthyologists and Herpetologist.* 1, 760.
- Kendall A.W., Ahlstrom E. H., Moser H. G. 1984. Early life history stages of Fishes and their characters. pp. 11-24, In: H.G. Moser, W.J. Richards, D.M. Cohen, M.P. Fahay, A.W. Kendall & S.L. Richardson (Eds.). *Ontogeny and Systematics of Fishes*, Amer. Soc. Ichthyol. Herpetol. Spec. Publi. I. Lawrence.
- Kiewek-Martínez N. M. 2004. Contribución al conocimiento de la reproducción en cautiverio de la cabrilla sardinera *Mycteroperca rosacea*. Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste. Tesis de maestría. 93 pp.
- Kiewek-Martínez N. M. 2009. Estudio de la reproducción en cautiverio de la cabrilla sardinera, *Mycteroperca rosacea*: inducción hormonal al Desove, esteroides sexuales y descripción del desarrollo gonadal en el ciclo reproductivo. Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste. Tesis de doctorado. 135 pp.
- Kinne O. 1977, *Marine Ecology, Vol. III, Cultivation, Part II*. New York. John Wiley and Sons. 1294 pp.
- Kitajima C., Takaya M., Tsukashima Y., Arakawa T. 1991. Development of eggs, larvae and juveniles of the grouper, *Epinephelus septemfasciatus*, reared in the 385 laboratory. *Japanese Journal of Ichthyology* 38, 47-56. 386.
- Kohno H., Diani S., Sunyoto P., Slamet B., Imanto. 1990. Early developmental events associated with changeover of nutrient sources in the grouper, *Epinephelus fuscoguttatus*, larvae. *Bulletin Penelitian Perikanan Special Edition* 1, 51-64.

- Kohno H., Ordonio-Aguilar R. S., Ohno A., Taki Y. 1997. Why is grouper larval rearing difficult? An approach from the development of the feeding apparatus in early stage larvae of the grouper, *Epinephelus coioides*. *Ichthyological Research* 44, 267-274.
- Koumoundouros G., Carrillo J., Divanach P., Kentouri M. 2004. The rearing of common dentex *Dentex dentex* (L.) During the hatchery and on-growing phases. *Aquaculture*. 240: 165-173.
- Kunz W. Y. 2004. *Developmental Biology of Teleost Fishes*. Springer. Dordrecht, Netherlands. 637 pp.
- Kuo M., Ting Y. Y., Yen S. L. 1988. Induced sex reversal and spawning of blue spotted grouper, *Epinephelus fario*. *Aquaculture* 71: 113-126.
- Lazo J. P., Holt G., Arnold C. 2000. Ontogeny of pancreatic enzymes in larval red drum *Sciaenops ocellatus*. *Aquaculture Nutrition*. 6: 183-192.
- Lazo J. P., Dinis M. T., Holt G. J., Faulk C., Arnold C. R. 2000. Co-feeding microparticulate diets with algae: toward eliminating the need of zooplankton at first feeding in larval red drum (*Sciaenops ocellatus*). *Aquaculture*. 188: 339-351.
- Lazo J. P., Mendoza R., Holt G. J., Aguilera C., Arnold C. R. 2007. Characterization of digestive enzymes during larval development of red drum (*Sciaenops ocellatus*). *Aquaculture*. 265: 194-205.
- Léger P. D., Grymonpré E., Van Ballaer E., Sorgeloos P. 1989. Advances in the enrich of rotifers and artemia as food sources in marine larviculture. *Eur. Aquac. Soc. Esp. Public*. 10, 141-142.
- Lehninger A. L. 1984. *Bioquímica*. 2^a ed. Omega. Barcelona, España. 1198 pp.
- Leis J. M. 1987. Review of the early life history of tropical groupers (Serranidae) and snappers (Lutjanidae), p. 189-237. In: J.J. Polovina and S. Ralston (eds), *Tropical Snappers and Groupers: Biology and Fisheries Management*. Westview Press, Boulder, CO, 659 pp.
- Lim L.C. 1993. Larviculture of the greasy grouper *Epinephelus tauvina* F. and the Brown marbled grouper *E. fuscoguttatus* F. in Singapore. *J. World Aquac. Soc.* 24 (2): 262-273.

- Lin K.-J., Yen C.-L., Huang T.-S., Liu C.-Y., Chen C.-L. 1986. *Experiments on the artificial propagation of black spotted grouper, Epinephelus salmonoides (Lacepade)-II, experiment of fry nursing of Epinephelus salmonoides (Lacepade) and its morphological study*. Annual Collected Reports of the Penghu Branch (Penghu Fishery Laboratory), Taiwan Fisheries Research Institute, Chilung, Taiwan 5, 50–72.
- Linares-Aranda Marcela. 2007. Efecto de la incorporación de levaduras vivas en el alimento sobre la capacidad digestiva en juveniles de la cabrilla sardinera *Mycteroperca rosacea* (Streets, 1877). Tesis de maestría. 70 pp.
- López L. M., Durazo E., Rodriguez-Gomez A., True C. D., Viana M. T. 2006. Proximate composition and fatty acid profile of wild and cultured juvenile *Totoaba macdonaldi*. *Ciencias marinas*. 32: 303-309.
- Luberda Z., Strzezek J., Luczynki M. 1993. Some proteolytic properties of hatching liquid in the sea trout, *Salmo trutta m. trutta* L. *Fish Physiol. Biochem.* 12: 75-80.
- Maraux S., Louvard D., Baratti J. 1973. The aminopeptidase from hog-intestinal brush border. *Biochim. Biophys. Acta* 321: 282-295.
- Margulies D. 1993. Assessment of the nutritional condition of larval and early juvenile tuna and Spanish mackerel (Pisces: Scombridae) in the Panama Bight. *Marine biology*. 115: 317-330.
- Martínez I., Moyano F. J., Fernandez-Diaz C., Yufera M. 1999. Digestive enzyme activity during larval development of the Senegal sole (*Solea senegalensis*). *Fish Physiology and Biochemistry*. 21: 317-323.
- Martínez-Lagos R., Gracia-López V. 2009. Morphological development and growth patterns of the leopard grouper *Mycteroperca rosacea* during larval development. *Aquaculture research*. (in press).
- Masuma S., Kanematu M., Teruya K. 1990. Embryonic and morphological development of larval and juveniles of the amberjack, *Seriola dumerili*. *Jpn. J. Ichthyol.* 37, 164-169.
- Mathews C. K., Van Holde K. E. 1998. *Bioquímica*, Mc Graw-Hill Interamericana. Madrid, España. 1283 pp.
- May R. C. 1974. Larvae mortality in marine fishes and the critical period concept. In: *The early life history of fish*. (Ed. by Blaxter.J.H.S.).pp. 1-19. Springer-Verlac. New York. USA.

- Mclay R. 1980. Activities of cathepsin A and D in cod muscle. *J. Sci. Food Agric.* 31: 1050-1054.
- Mendoza-Bustamante J. A. 2002. Aspectos ecológicos del reclutamiento de la cabrilla sardinera *Mycteroperca rosacea*. Streets. 1877. (Pisces: Serranidae) En camas de sargazo de San Juan de la costa B.C.S. México. Tesis de Licenciatura, Universidad Autónoma de B.C.S. Noviembre del 2002.
- Meza-Gonzales R., Benítez-Flores J., Paredes-Domínguez M., González-Valle M. 2002. Descripción histológica del sistema digestivo en larvas de *Chirostoma humboldtianum* en la primera alimentación exógena. CIVA 2002. (<http://www.civa2002.org>), 313-322.
- Moretti A., Pedini Fernandez-Criado M., Cittolin G., Guidastri R. 1999. Manual Hatchery Production of Seabass and Gilthead Seabream. Vol 1. Rome, FAO. 194 pp.
- Morais S., Cahu C., Zambonino-Infante J., Robin J., Rønnestad I., Dinis M. T., Conceição Lec. 2004. Dietary TAG source level affect performance and lipase expression in larval sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Lipids* 39: 449-458.
- Moyano F. J., Díaz M., Alarcón F. J., Sarasquete M. C. 1996. Characterization of digestive enzyme activity during larval development of gilthead seabream (*Sparus aurata*). *Fish Physiology and Biochemistry*. 15: 121-130.
- Muhlia-Melo A., Guerrero-Tortolero D., Perez-Urbiola J., Campos-Ramos R. 2003. Results of spontaneous spawning of yellow snapper (*Lutjanus argentiventris* Peters, 1869) reared in inland ponds in La Paz, Baja California Sur, Mexico. *Fish Physiology and Biochemistry*. 28: 511-512.
- Muller-Feuga A. 2000. The role of microalgae in aquaculture: situation and trends. *J. Appl. Phycol.* 12, 527-534.
- Nash C. E., Kuo, C.M., McConnell, S.C. 1974. Operational procedures for rearing larvae of grey mullet (*Mugil cephalus* L.) *Aquaculture* 3:15-24.
- Nanton D. A., Castell J. D. 1998. The effects of dietary fatty acids on the fatty acid compositions of the arcticopod copepod *Tisbe* sp., for use as a live food for marine fish larvae. *Aquaculture*. 163, 251-261.
- Nicholson J. A., Kim Y. S. 1975. A one-step L-amino acid oxidase assay for intestinal peptide hydrolase activity. *Anal. Biochem.* 63: 110-117.
- Nwosu F. M., Holzloehner S. 2000. Effect of light periodicity and intensity on the growth and survival of *Heterobranchus longifilis* Val. 1840 (Teleostei: Clariidae) larvae after 14 days of rearing. *Journal of Applied Ichthyology*. 16: 24-26.

- Ortiz-Galindo J. L. 1991. Ontogenia inicial de la mojarra rayada *Eugerres axillaris* Gunther, 1864. Tesis de Maestría, CICIMAR-IPN. 64 pp.
- Ostrowki A. C. 1989. Effect of rearing tank background color on early survival of dolphin larvae. *Prog-Fish Cult.* 51, 161-163.
- Osse J. W. M., Van Den Boogart J. G. M. 1995. *Fish larvae, development, allometric growth, and the aquatic environment.* ICES Marine Science Symposia 201, 21-34.
- Ounais-Guchemann N. 1989. Definition d' un modele d' elevage larvarientesif pour la dourade *Sparus aurata*. Ph.D. d' Aix Marseille II 184 pp. Thesis.
- Ozawa T., K. Kawai., I. Uotani. 1991. Stomach content análisis of chub mackerel *Scomber japonicus* larvae by quantification meted. *Nippon Suisan Gakkaishi* 57: 1241-1245.
- Papoutsoglou S. E., Mylonakis G., Miliou H., Karakatsouli N. P., Chadio, S. 2000. Effects of background color and growth performances and physiological resposes of scaled carp (*Ciprinus carpio* L.) reared in a closed circulated sistem. *Aquaculture Engineering.* 22, 309-318.
- Parazo M., Avila E. M., Reyes D. M. 1991. Size- and weight-dependent cannibalism in hatchery-bred sea bass (*Lates calcarifer* Bloch). *Journal of Applied Ichthyology/Zeitschrift fur Angewandte Ichthyologie* 7, 1-7.
- Parra G., Yufera M. 2000. Feeding, physiology and growth responses in first-feeding gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.) larvae in relation to prey density. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology.* 243: 1-15.
- Parrish J. D. 1987. The trophic biology of snapers and groupers. En: Polovina J,J, and Ralston S. (Eds.) *Tropical Snapers and Groupers: Biology and fisheries management.* Westview press, Boulder. pp 405-459.
- Peña R., Dumas S., Villalejo-Fuerte M., Ortiz-Galindo Jl. 2003. Ontogenetic development of the digestive tract in reared spotted sand bass *Paralabrax maculatofasciatus* larvae. *Aquaculture.* 219: 633-644.
- Peña R., Dumas S., Zaldívar-Lucio R., García G., Trasvina A., Hernández-Ceballos, D. 2004. The effect of light intensity on first feeding of the spotted sand bass *Paralabrax maculatofasciatus* (Steindachner) larvae. *Aquaculture Research.* 35: 345-349.
- Peña Renato., Dumas Silvie., Trasvina Ana., García Gerardo., Pliego-Cortez Hugo. 2005a. Effects of tank colour and prey density on first feeding of the spotted sand bass *Paralabrax maculatofasciatus* (Steindachner) larvae. *Aquaculture Research.* 36: 1239-1242.

- Peña R., Dumas S., Saldivar-Lucio R., Garcia G., Trasvina A., Hernandez-Ceballos D. 2005b. The effect of light intensity on first feeding of the spotted sand bass *Paralabrax maculatofasciatus* (Steindachner) larvae. *Aquaculture Research*. 35: 345-349.
- Peláez-Mendoza A. K. 1997. Hábitos alimenticios de la cabrilla sardinera *Mycteroperca rosacea*. Streets. 1877. (Pisces: Serranidae) En la Bahía de la Paz B.C.S. y Zonas adyacentes. Tesis de licenciatura. Universidad Autónoma de B. C. S. mayo 1997.
- Perés A, Infante J. L, Cahu C. 1998. Dietary regulation of activities and mRNA levels of trypsin and amylase in sea bass (*Dicentrarchus labrax*) larvae. *Fish Physiology and Biochemistry*. 19: 145-152.
- Pérez-Benavente G., Gatesoupe, F. J. 1988. Bacteria associated with cultured rotifers and *Artemia* are detrimental to larval turbot, *Scophthalmus maximus* L. *Aquac. Eng.* 7: 289-293.
- Pepin P. 1991. Effect of temperature and size on development mortality, and survival rates of the pelagic early life history stages of marine fish. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 48:503-518.
- Piper R. G., McElwain I. B., Orme L. E., McCraren., Fowler L.G., Leonard J.R. 1982. *Fish hatchery management*. Washington. United States Department of the Interior fish and wildlife service, 5^a ed., 517 pp.
- Planas M., Cunha I. 1999. Larviculture of marine fish: Problems and perspectives. *Aquaculture*: 177: 171-190.
- Rainuzzo J. R., Reitan K. I., Olsen Y. 1997. The significance of lipids at early stages of marine fish: a review. *Aquaculture*. 155: 105-118.
- Rathore R. M., Kumar S., Chakrabarti R. 2005. Digestive enzyme profile of *Cyprinus carpio* during ontogenic development. *Journal of World Aquaculture Society*. 36: 37-41.
- Reyes-Becerril M., Tovar-Ramírez D., Ascencio-Valle F., Civera-Cerecedo R., Gracia-López V., Barbosa-Solomieu V. 2008. Effects of dietary live yeast *Debaryomyces hansenii* on the immune and antioxidant system in juvenile leopard grouper *Mycteroperca rosacea* exposed to stress. *Aquaculture*. 280: 39-44.
- Ribeiro L, Zambonino-Infante J. L., Cahu C Dinis M. T. 1999. Development of digestive enzymes in larvae of *Solea senegalensis*, Kaup 1858. *Aquaculture*. 179: 465-473.

- Ricci M., Fifi A. P., Ragni A., Schlechtriem C., Focken U. 2003. Development of a low-cost technology for mass production of the free-living nematode *Panagrellus redivivus* as an alternative live food for first feeding fish larvae. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 60: 556-559.
- Rippingale R. J., Payne M. F. 2001. Intensive cultivation of a calanoid copepod *Gladioferens imparipes*. Department of Environmental Biology. Curtin University of Technology. Australia. 67 pp.
- Rombaut G., Grommen R., Zizhong Q., Vanhoof V., Suantika G., Dhert P., Sorgeloos P., Verstraete W. 2003. Improved performance of an intensive rotifer culture system by using a nitrifying inoculum (ABIL). *Aquaculture Research*. 34: 165-174.
- Roseblatt R. H., Zahuranec B. J. 1967. The Eastern Pacific Grouper of the genus *Mycteroperca*, including a new species. *Calif. Fish Game* 53 (4): 228-245.
- Rueda F. M., Martínez F. J. 2000. A review on the biology and potential aquaculture of *Dentex dentex*. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*. 11: 57-70.
- SAGARPA. 2007. Anuario estadístico de acuicultura y pesca. Mazatlán Sinaloa, México. 219 pp.
- Sánchez-Velasco L., W. Norbis. 1997. Comparative diets and feeding habits of Boops boops and *Diplodus sargus* larvae, two sparid fishes co-occurring in the northwestern Mediterranean (May 1992). *Bull. Mar Sci*. 61: 821-835.
- Sarasquete M. C., Polo A., Yufera M. 1995. Histology and histochemistry of the development of the digestive system of larval gilthead sea bream, *Sparus aurata* L. *Aquaculture*. 130: 79-92.
- Sargent J. R. 1995. Origins and functions of egg lipids: Nutritional implications. In: Bromage, N.R., Roberts, R.J. (Eds.), *Broodstock management and egg and larval quality*. Blackwell, Oxford, pp. 353-372.
- Santamaria C. A., Marin De Mateo M., Traveset R., Sala R., Grau A., Pastor E., Sarasquete C., Crespo S. 2004. Larval organogenesis in common dentex *Dentex dentex* L. (Sparidae): histological and histochemical aspects. *Aquaculture*. 237: 207-228.
- Schauer P. S., Simpson K. L. 1985. Bioaccumulation and bioconversion of dietary labeled fatty acids in *Artemia* and winter flounder (*Pseudopleuronectes americanus*). *Can. J. Fish. Aquat. Sci*. 42: 1430-1438.
- Scocco P., Accili D., Menghi G., Ceccarelli P. 1998. Unusual glycoconjugates in the oesophagus of a tilapine polyhybrid. *Journal of Fish Biology*. 53: 39-48.

- Segner H., Storch V., Reinecke M., Kloas W., Hanke W. 1994. The development and functional digestive and metabolic organs in turbot, *Scophthalmus maximus*. Mar. Biol. 119: 471-486.
- Serrano-Pinto V., Caraveo-Patiño J. 1999. Survival of Amarillo snapper *Lutjanus argentiventris* (Peters 1869) at different salinities in captivity. Aquaculture Research. 30: 467-470.
- Siebert G. 1958. Aktivität eiweiss spaltender enzyme in fischen. Experientia. 14: 65-66.
- Sis R. F., Ives P. J., Jones D. M., Lewis D. H., Haensly E. 1979. The microscopic anatomy of the esophagus, stomach, and intestine of the channel cat fish, *Ictalurus punctatus*. Journal of fish biology. 14: 179-186.
- Shiri Harzevili A., Dooremont I., Vugth I., Auwerx J., Quataert P., De Charleroy D. 2004. First feeding of burbot, *Lota lota* (Gadidae, Teleostei) larvae under different temperature and ligh condition. Aquaculture Reserch, 35: 49-55.
- Shirota A. 1970. Studies on the mouth size of fish larvae. Bulletin of the Japanese 422 Society of Scientific Fisheries 36, 353-368.
- Shipp G. R., Bosmans J. M., Marshall A. J. 2001. A method for hachery culture of tropical calanoid copepods, *Acartia spp*. Aquaculture. 174, 81-88.
- Skiftesvik A. B. 1994. Impact of physical environment on the behavior of cod larvae. ICES Mar. Sci. Symp. 198: 646-653.
- Solórzano L. 1969. Determination of ammonia in natural water by the phenolhypochlorite method. Journal Limnology and Oceanography. 14: 799-801.
- Solomon E. P., Berg L. R., Villee C. 1998. Biología de Ville. 4^{ta} Ed. McGraw-Hill Interamericana. México. 1305 pp.
- Sorgeloos P., Dhert P., Candreva P. 2001. Use of the brine shrimp, *Artemia sp*. In marine fish larviculture. Aquaculture 200, 147-159.
- Sparre P., Venema S. C. 1998. Introduction to tropical fish stock assessment. *Part I*. Manual. FAO Fisheries Technical Paper. No. 306.1, Rev. 2, Rome. 407 pp.
- Steinarsson A., Björnsson B. 1999. The effects of temperature and size on growth and mortality of cod larvae. *Journal of Fish Biology* 55 (Suppl. A), 100-109.
- Støttrup G. J., Nosker N. H. 1997. Production and use of copepods in marine fish larviculture. Aquaculture, 155, 231-247.

- Spedicato M.T., Lembo G., Di Marco P., Marino G. 1995., Preliminary results in the breeding of dusky grouper *Epinephelus marginatus* (Lowe, 1834). Cah. Option Méditerran. 16: 131-148.
- Stroband H. W. J., Kroon A. G. 1981. The Development of the Stomach in *Clarias lazera* and the Intestinal Absorption of Protein Macromolecules. Cell and Tissue Research. 215: 397-415.
- Stroud R. 1975. A family of proteins-cutting proteins. Sci. Am. 231, 74-89.
- Sweetman J. W. 1992. Larviculture of Mediterranean fish species: current status and future trends. Journal of the World Aquaculture Society 23: 330-337.
- Tanaka M. 1971. Studies on the structure and function of the digestive system in teleost larvae-III. Development of the digestive system during postlarval stage. Jap. J. Ichthyol. 18: 164-174.
- Tait M. J., Hichman R.W. 2001. Reproduction, gamete supply and larval rearing of New Zealand turbot *Colistium nudipinnis* (Jutton 1873): a potential new aquaculture species. Aquac. Res. 32: 717-725.
- Tandler A., Anav F. A., Choshniak I. 1995. The effect of salinity on growth rate, survival and swimbladder inflation in gilthead sea bream, *Sparus aurata*, larvae. *Aquaculture* 135, 343-353.
- Teng S., Zahr C., Al-Abdul-Elah K., Almatro S. 1999. Pilot scale spawning and fry production of blue-fin porgy, *Sparidentex hasta* (Valenciennes) in Kuwait. *Aquaculture* 178:27-41.
- Tookwinas S. 1990. Review of knowledge on grouper aquaculture in south east Asia. En: Barret J. (Ed.) Actes de colloques. Institut Francais de Recherche pour l'Exploitation de la Mer, Brest, Avances in tropical aquaculture workshop. ACUACOP, IFREMER. Tahiti, 9: 429-435.
- Toledo J.D., Caberoy N. B., Quintio G. F., Choresca Jr. Ch., Nakagawa., Heisuke. 2002. Effects of salinity, aeration and light intensity on oil globule absorption, feeding incidence, growth and survival of early-stage grouper *Epinephelus coioides* larvae. *Fisheries Science*. 68: 478-483.
- Tucker W. J. 1998. Marine Fish Culture. Kluwer Academic Publishers. Boston.750 pp.
- Tucker J. W. Jr. 1999. Species profile. Grouper aquaculture. Southern Regional Aquaculture Center. S.R.A.C. Publication. 721 pp.
- Tucker J. W. Jr. 2003. Grouper culture. *World Aquac.* 34 (3): 32-39.

- Ueberschäer B. 1993. Measurement of proteolytic enzyme activity: significance and application in larval fish research. In: Walther BT, Fyhn HJ. (Eds.), *Physiological and biochemical aspects of fish development*, Univ. Bergen, Bergen, (Norway), pp.355.
- Umeda S., Yamasaki K., Sugimoto M., Ochiai A. 1987. On the differentiation and development of the digestive system of the amberjack, *Seriola lalandi*, from the larval to juvenile stage. *Bulletin of marine sciences and fisheries*, Kochi University. 9: 223-231.
- Vega-Villasante F., Nolasco H., Civera R. 1993. The digestive enzymes of the Pacific brown shrimp *Penaeus californiensis*. 1. Properties of amylase activity in the digestive tract. *Comparative Biochemistry and Physiology* 106: 547-550.
- Versaw W., Cuppett S. L., Winters D. D., Williams L. E. 1989. An improved colorimetric assay for bacterial lipase in nonfat dry milk. *J. Food Sci.* 54: 232-254.
- Von Oertzen J. A. 1985. Resistance and capacity adaptation of juvenile silver carp, *Hypophthalmichthys molitrix* (Val.), to temperature and salinity. *Aquaculture* 44, 321-332.
- Wang H., Fang Q., Zheng L. 2001. Morphological development and growth of the larvae, Juveniles and young fish of *Epinephelus akaara*. *Journal of Shanghai Fisheries University/Shanghai Shuichan Daxue Xuebao* 10, 307-312.
- Walford J., Lam T. J. 1993. Development of digestive tract and proteolytic enzyme activity in sea bass (*Lates calcarifer*) larvae and juveniles. *Aquaculture*. 109: 187-205.
- Whitaker J. R. 1994. *Principles of enzymology for the food sciences*. 2a ed., Marcel Dekker, INC, New York. 789 pp.
- Watanabe Y. 1984. Morphological and functional changes in rectal epithelium cells of pond smelt during postembryonic development. *Nippon Suisan Gakkaishi*. 50: 805-814.
- Watanabe W. O., Ellis S. C., Ellis E. P., Gracia V., Bass P., Ginoza J. Moriwake A. 1996. Evaluation of first-feeding regimens for larval Nassau grouper *Epinephelus striatus* and preliminary, pilot-scale culture through metamorphosis. *Journal of the World Aquaculture Society* 27, 323-331.
- Wilcox Jeffrey A., Tracy Patrick L., Marcus Nancy H. 2006. Improving live feeds: effect of a mixed diet of copepod Nauplii ("*Acartia tonsa*") and rotifers on the survival and growth of first-feeding larvae of the southern flounder, "*Paralichthys lethostigma*". *Journal of the World Aquaculture Society*. 37: 113-120.

- Xie Y., Wen Z., Su Y., Wang J. 2007. Studies on growth and feeding of larva and juvenile of *Epinephelus coioides*. *Journal of Xiamen University. Natural Science/Xiamen Daxue Xuebao* 46, 123-130.
- Yamamoto T. S., W. Kobayashi. 1992. Closure of micropyle during embryonic development of some pelagic fish eggs. *J. Ichthyol.* 27: 301-308.
- Zacarias M., Muguet J. B., Lazo J. P. 2006. Proteolytic Activity in California Halibut Larvae, (*Paralichthys californicus*). *Journal of the World Aqua. Soc.* 37: 175-285.
- Zambonino-Infante J. L., Cahu C. 1994. Development and response to a diet change of some digestive enzymes in sea bass (*Dicentrarchus labrax*) larvae. *Fish Physiology and Biochemistry.* 12: 399-408.
- Zambonino-Infante J. L., Cahu C. 2001. Ontogeny of the gastrointestinal tract of marine fish larvae. *Comparative Biochemistry and Physiology.* 130: 477-487.
- Zepeda-Núñez F. E. 2007. Expresión génica diferencial en el riñón de *Mycteroperca rosacea* por vacunación con adn plasmídico. Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste. Tesis de maestría. 56 pp.
- Zhang H., Liu X., Liufu Y., Wang Y., Lin L., Huang G., Shu H., Lou G., Lin H. 2006. Embryonic development, morphological development of larva, juvenile and young fish of *Epinephelus coioides*. *Journal of Fishery Sciences of China/Zhongguo Shuichan Kexue* 13, 689-696.
- Zimmer G., Reuter G., Schauer R., 1992. Use of influenza c-virus for detection of acetylated sialic acids on immobilized conjugates by esterase activity. *Eur. J. Biochem.* 204: 209-215.
- Zouiten D., Khemis I. B., Besbes R., Cahu C. 2008. Ontogeny of the digestive tract of thick lipped grey mullet (*Chelon labrosus*) larvae reared in "mesocosms". *Aquaculture.* Vol. 279, no. 1-4, pp. 166-172.