

TESIS DEFENDIDA POR
JOSÉ ANTONIO MATA SOTRES
Y APROBADA POR EL SIGUIENTE COMITÉ

Dr. Juan Pablo Lazo Corvera

Director del Comité

Dra. Beatriz Cordero Esquivel

Miembro del Comité

Dr. Ernesto García Mendoza

Miembro del Comité

Dra. Carmen Paniagua Chávez

*Coordinador del programa de
posgrado en Ciencias en
Acuicultura*

Dr. David Hilario Covarrubias Rosales

Director de Estudios de Posgrado

15 de diciembre de 2010

**CENTRO DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA Y DE EDUCACIÓN SUPERIOR
DE ENSENADA**



**PROGRAMA DE POSGRADO EN CIENCIAS
EN ACUICULTURA**

**EVALUACIÓN DEL ÉXITO EN EL DESTETE EN LARVAS DE
TOTOABA (*Totoaba macdonaldi*) Y JUREL COLA AMARILLA
(*Seriola lalandi dorsalis*) UTILIZANDO EL CRECIMIENTO,
SUPERVIVENCIA Y/O TASAS DE INGESTIÓN**

TESIS

que para cubrir parcialmente los requisitos necesarios para obtener el grado de
MAESTRO EN CIENCIAS

Presenta:

JOSÉ ANTONIO MATA SOTRES

Ensenada, Baja California, México, diciembre de 2010

RESUMEN de la tesis de **José Antonio Mata Sotres**, presentada como requisito parcial para la obtención del grado de MAESTRO EN CIENCIAS en Acuicultura. Ensenada, Baja California. Diciembre de 2010.

**EVALUACIÓN DEL ÉXITO EN EL DESTETE EN LARVAS DE TOTOABA
(*Totoaba macdonaldi*) Y JUREL COLA AMARILLA (*Seriola lalandi dorsalis*)
UTILIZANDO EL CRECIMIENTO, SUPERVIVENCIA Y/O TASAS DE
INGESTIÓN**

Resumen aprobado por:

Dr. Juan Pablo Lazo Corvera
Director de Tesis

En los laboratorios de producción de peces marinos se utiliza alimento vivo (rotíferos y *Artemia*) para el cultivo larvario. No obstante, el alimento vivo es deficiente en ciertos nutrientes esenciales (en particular, los ácidos grasos altamente insaturados, HUFA) y su producción consistente es costosa, impredecible y laboriosa. Durante las últimas tres décadas, se ha realizado grandes esfuerzos en el desarrollo de microdietas para reemplazar el uso del alimento vivo por medio de su reemplazo gradual por microdietas durante el destete. Dos de las causas principales del poco éxito en el destete son las bajas tasas de ingestión y digestión de las microdietas. Aunque las larvas cuentan con un sistema digestivo capaz de digerir cierto tipo de alimentos, las microdietas no estimulan adecuadamente la secreción de enzimas digestivas. Además, la capacidad de las larvas de absorber y transportar los nutrientes digeridos es limitada, sobre todo en las etapas tempranas de desarrollo. Algunas sustancias secretadas por el alimento vivo funcionan como “atractantes” y estimulan una respuesta alimentaria, pero no suelen estar presentes en las microdietas. Se diseñaron dos experimentos orientados a evaluar el efecto de la edad de las larvas en el éxito del destete en dos especies con alto potencial para su cultivo en México: la totoaba (*Totoaba macdonaldi*) y el jurel cola amarilla (*Seriola lalandi dorsalis*).

En el primer experimento se evaluó el éxito del destete en larvas de totoaba de 17, 22 y 27 días después de la eclosión (DDE) utilizando el crecimiento, supervivencia y factor de condición como variables de respuesta. Al finalizar el experimento (35

DDE), se observó una respuesta positiva en el crecimiento en peso y longitud y un mejor factor de condición en las larvas sometidas al destete, en particular en las larvas del destete temprano (17 DDE). Sin embargo, la supervivencia fue significativamente mayor en los tratamientos control (i.e., donde las larvas fueron alimentadas con presas vivas) para cada una de las edades evaluadas. Aunque no se evaluó cuantitativamente, es probable que el canibalismo observado en los tratamientos destetados haya tenido un efecto importante en la mortalidad. Con base en los resultados del crecimiento de las larvas de totoaba en cada una de las diferentes fechas de destete y pese a la menor supervivencia en comparación con el control, es posible iniciar el destete temprano a los 17 DDE como una estrategia para reducir los costos de producción de juveniles e incrementar la rentabilidad del cultivo, ya que se puede evitar el uso de *Artemia*.

En el segundo experimento se evaluó el efecto de algunos atractantes, en las tasas de ingestión de microdietas en larvas de jurel destetadas a los 5, 10, 15 y 20 DDE. Los atractantes evaluados fueron; alanina, betaína, inosina-5-monofostato y serina y fueron agregados por separado o en mezcla a una concentración de 10^{-3} M en el agua. Para este experimento, primero se desarrolló una técnica para estimar la tasa de ingestión del alimento utilizando micro-esferas fluorescentes incluidas en las microdietas. Con base en la fluorescencia medida en los intestinos de las larvas de jurel se logró estimar exitosamente la cantidad de alimento consumido. Las larvas consumieron la microdieta desde los 5 DDE. No se observaron diferencias significativas en las tasas de ingestión de la microdieta utilizando los diferentes atractantes por separado o en combinación, con excepción de la mezcla de estos a los 15 DDE. Esto se puede atribuir al efecto sinérgico de la mezcla de los atractantes, pero no es claro porque únicamente se observó el efecto a esta edad. Sin embargo, no se logró observar un incremento consistente en las tasas de ingestión por efecto de los atractantes a las concentraciones evaluadas en el presente estudio. Es necesario realizar estudios evaluando el efecto de estos atractantes en diversas combinaciones y concentraciones para identificar cuáles logran estimular adecuadamente la ingestión de las microdietas. El desarrollo de una técnica confiable para cuantificar las tasas de ingestión del alimento en la etapa larval facilitará la investigación y desarrollo de nuevas microdietas con las cuales se logren optimizar los protocolos de destete en el cultivo larvario de peces marinos.

Palabras Clave: Cultivo larvario, *Seriola lalandi*, *Totoaba macdonaldi*, destete, microdietas, atractantes, tasas de ingestión.

ABSTRACT of the thesis presented by **José Antonio Mata Sotres** as a partial requirement to obtain the MASTER OF SCIENCE degree in Aquaculture. Ensenada, Baja California, México. December 2010.

EVALUATION OF WEANING PERFORMANCE IN TOTOABA (*Totoaba macdonaldi*) AND YELLOWTAIL KINGFISH (*Seriola lalandi dorsalis*) LARVAE USING GROWTH, SURVIVAL AND/OR INGESTION RATES

The culture of marine fish larvae requires the use of live feeds such as rotifers and *Artemia* which are deficient in certain essential nutrients (i.e., particularly the highly unsaturated fatty acids, HUFA's) and are expensive, unpredictable and time consuming to produce. Over the last three decades significant progress has been made to replace live feeds with formulated microdiets, however success has been limited. Two main factors typically attributed to this lack of success are the low digestion and ingestion rates of the weaning diets used. Although larval digestive system is equipped to handle certain type of feeds, microdiets do not effectively stimulate secretion of digestive enzymes. In addition, larvae have a limited capacity to assimilate and transport digested nutrients. Moreover, certain compounds that act as feed attractants are present in live feeds but not in the microdiets. Thus, two experiments were performed to evaluate the effect of age on weaning success in two commercially important species: the totoaba (*Totoaba macdonaldi*) and yellowtail kingfish (*Seriola lalandi dorsalis*).

For the first experiment, we evaluated weaning success of totoaba larvae onto a microdiet at various stages of development utilizing growth, survival and condition factor. Weaning onto a microdiet was evaluated at 17, 22 and 27 days post hatch (DPH). At the end of the experiment (35 DPH), growth was significantly increased in all weaning treatments compared to the controls (i.e., feed live prey), except for the 22 DPH group and no significant differences were found among them. However, survival was significantly lower in the microdiet-fed treatments compared to the control groups. Although the experiment was not design to evaluate cannibalism, this behavior was observed towards the end of the weaning trial and may have contributed significantly to the mortalities observed in the weaned treatments. Based on this results and despite of the lower survival, it's possible to perform an early weaning (17 DPH) in totoaba larvae, as a strategy to reduce juvenile production costs and increase profitability of the production system, by reducing the use of *Artemia*.

For the second experiment, we evaluated the effect of several attractants on microdiet ingestion rates of yellowtail kingfish larvae weaned at different stages of development. Four commonly used attractants (alanine, betaine, inosine-5-monophosphate and serine) were evaluated 5, 10, 15 and 20 DPH alone or in combination at a concentration of 10^{-3} M in the water column. For this experiment, we first developed a technique to quantify food intake using fluorescent-

microspheres incorporated into the microdiet. Based on the fluorescence measured in the larval intestines we were able to successfully quantify microdiet ingestion rates. Yellowtail larvae ingested the microdiet as early as 5 DPH. No significant differences were found on microdiet ingestion rates among the attractants evaluated either alone or in combination, except for the mixture treatment evaluated 15 DPH. It is possible that a synergetic effect among the attractants could have been responsible for these results, but it is not clear why we only observed this effect at this stage of development. However, we were not able to clearly demonstrate a significant effect of the attractants at the concentrations evaluated in this experiment. Further studies are warranted evaluating the effect of different combinations and concentrations of these attractants in stimulating microdiet ingestion rates in marine fish larvae. Nevertheless, the development of a reliable technique to quantify microdiet ingestion rates during the larval stages will certainly help further research to develop new microdiets to optimize weaning protocols for marine fish larvae.

Keywords: *Seriola lalandi*, *Totoaba macdonaldi*, weaning, microdiets, attractants, ingestion rates.

DEDICATORIAS

A mis padres, y hermanos, por creer en mí en todo momento

Este es su trabajo

A todas las personas que han influido en mi vida

AGRADECIMIENTOS

Al **Dr. Juan Pablo Lazo**, por su apoyo, confianza, consejos, amistad y sobre todo la gran paciencia que me tuvo en todo momento. En verdad no sabes cómo te lo agradezco.

A los doctores **Beatriz Cordero** y **Ernesto García**, por sus consejos y ayuda para que el trabajo saliera de la mejor manera.

A todos los doctores que me brindaron su amistad y consejos para mejorar en todos los aspectos.

A los técnicos **Oc. Jesús Mariscal** y **Biól. Uvinaí Salgado** por todo el apoyo en la realización de ambos cultivos, pero en especial por su amistad.

Al **CONACYT** por otorgarme la beca sin la cual no hubiera sido posible la realización de la maestría.

A todo el personal administrativo, en especial a **Varuní Arredondo** por estar siempre al pendiente mío.

A TODOS mis compañeros de generación y posgrado por los buenos momentos que vivimos. En especial a la banda de aquí **Rocío, Alberto, Pech y Ale**.

A **Gloria** y **Dany**, por su invaluable amistad y por hacerme sentir parte de una familia en estas latitudes (no ha de ser fácil vivir conmigo).

A **Rosita**, por su cariño y apoyo incondicional. En especial por hacerme creer de nuevo en tantas cosas y darme cuenta de mis errores.

CONTENIDO

| | | |
|---|--|------------|
| CONTENIDO | | vii |
| LISTA DE FIGURAS | | x |
| LISTA DE TABLAS | | xiv |
| I. INTRODUCCIÓN | | 1 |
| II. ANTECEDENTES | | 4 |
| II.2. Jurel Cola Amarilla: Biología y Cultivo | | 6 |
| II.3. La alimentación en las etapas larvarias de peces marinos | | 8 |
| II.4. Destete y co-alimentación | | 10 |
| II.5. Requerimientos nutricionales de las larvas | | 11 |
| II.6. Ontogenia y Capacidad digestiva en larvas de peces marinos | | 13 |
| II.7. Identificación e ingesta del alimento | | 14 |
| II.7.1. Quimiorrecepción | | 14 |
| II.7.2. Órganos sensoriales | | 16 |
| II.7.2.1. Sentido del gusto | | 16 |
| II.7.2.2. Sentido del olfato | | 18 |
| II.7.3. Comportamiento alimentario de larvas de peces marinos | | 19 |
| II.7.3.1. Incorporación de atractantes en el uso de microdietas en el cultivo larvario | | 20 |
| III. HIPÓTESIS | | 21 |
| IV. OBJETIVOS | | 22 |
| IV.1. Objetivos Generales | | 22 |

| | | |
|----------|--|----|
| IV.2. | Objetivos Específicos..... | 22 |
| V. | MATERIALES Y METODOLOGIA | 23 |
| V.1. | Efecto de la edad en el éxito del destete en larvas de totoaba (<i>T. macdonaldi</i>)...23 | |
| V.1.1. | Diseño experimental..... | 23 |
| V.1.2. | Cultivo larval de totoaba | 24 |
| V.1.3. | Bioensayo del experimento de larvas de totoaba (<i>T. macdonaldi</i>)..... | 26 |
| V.2. | Efecto de atrayentes sobre la tasa de ingestión de microdietas en larvas de jurel cola amarilla (<i>S. lalandi dorsalis</i>) | 29 |
| V.2.1. | Cultivo larval..... | 29 |
| V.2.2. | Formulación y preparación de las microdietas | 31 |
| V.2.3. | Bioensayo del experimento de larvas de jurel cola amarilla (<i>S. lalandi</i>). | 32 |
| V.2.4. | Cuantificación de los niveles de fluorescencia..... | 34 |
| V.2.4.1. | Curva de Calibración..... | 36 |
| V.2.4.2. | Determinación de un estándar de fluorescencia..... | 36 |
| V.3. | Análisis estadístico: | 37 |
| VI. | RESULTADOS | 38 |
| VI.1. | Efecto de la edad de las larvas de totoaba (<i>T. macdonaldi</i>) en el éxito en el destete | 38 |
| VI.1.1. | Destete temprano (17 DDE) | 39 |
| VI.1.2. | Destete intermedio (22DDE) | 41 |
| VI.1.3. | Destete tardío (27DDE)..... | 43 |

| | | |
|---------|--|----|
| VI.1.4. | Comparación de los destetes en las diferentes edades | 45 |
| VI.2. | Efecto de atractantes sobre la tasa de ingestión de microdietas en larvas de jurel cola amarilla (<i>S. lalandi dorsalis</i>) Quita el subrayado | 48 |
| VI.2.1. | Tasa de ingestión obtenida a los 5 DDE | 48 |
| VI.2.2. | Tasa de ingestión obtenida a los 10DDE | 49 |
| VI.2.3. | Tasa de ingestión obtenida a los 15DDE | 50 |
| VI.2.4. | Tasa de ingestión obtenida a los 20DDE | 50 |
| VII. | DISCUSIONES | 52 |
| VII.1. | Efecto de la edad en el éxito del destete en larvas de totoaba (<i>T. macdonaldi</i>)...52 | |
| VII.2. | Efecto de atractantes sobre la tasa de ingestión de microdietas en larvas de jurel cola amarilla (<i>S. lalandi dorsalis</i>) | 57 |
| VIII. | CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES | 61 |
| VIII.1. | Totoaba..... | 61 |
| VIII.2. | Jurel | 61 |
| IX. | BIBLIOGRAFIA | 62 |
| X. | ANEXO | 75 |
| X.1. | Curva de calibración para determinar la tasa de ingestión. | 75 |
| X.2. | Curva de calibración para determinar la fluorescencia en base a unidades de Fluoresceína..... | 75 |
| X.3. | Curva de calibración para determinar la fluorescencia presente en las microesferas fluorescentes..... | 76 |

LISTA DE FIGURAS

| <i>Figura</i> | | Página |
|---------------|--|--------|
| 1 | Protocolo exitoso de destete en base al tipo de alimento proporcionado a las larvas en relación a los días después de la eclosión (DDE) y su desarrollo | 11 |
| 2 | Proceso de alimentación: (a) reacción general no específica, comienza la búsqueda de alimento – estímulos químicos y eléctricos; (b) identificación y localización de la partícula de alimento estímulos químicos; (c) identificación cercana de la partícula de alimento estímulos químicos y visuales; (d) palatabilidad /ingesta estímulos químicos (papilas gustativas). (Tomado de Kolkovski <i>et al.</i> , 2009). | 15 |
| 3 | Microscopia Electrónica de Barrido (MEB) de un poro apical de una papila gustativa localizada en el epitelio craneal del una carpa africana (<i>Phreathichthys andruzzi</i>) en donde se observan las células claras (flechas) y oscuras (el tamaño del poro es de 5 μm \times 7 μm). (Tomado de Lamb, 2001). | 17 |
| 4 | (a) MEB del tejido epitelial de la cavidad nasal del salmón chien (<i>Oncorhynchus keta</i>), donde se observan las células receptoras (mu) y las microvellosidades (r). (b) MEB de una roseta olfativa de salmón chien (<i>Oncorhynchus keta</i>) (Tomado de Yamamoto y Ueda 1977). | 18 |
| 5 | Longitud Estándar (mm) en relación al destete temprano el 17 DDE (D17) y su control (C17) en larvas de totoaba. Las barras de error representan la desviación estándar de la media (n=3). Las columnas con diferentes letras indican diferencia significativas a $p < 0.05$ | 40 |
| 6 | Peso Seco (mg) en relación al destete temprano el 17 DDE (D17) y su control (C17) en larvas de totoaba. Las barras de error representan la desviación estándar de la media (n=3). Las columnas con diferentes letras indican diferencia significativas a $p < 0.05$ | 40 |
| 7 | Supervivencia (%) en relación al destete temprano el 17 DDE (D17) y su control (C17) en larvas de totoaba. Las barras de error representan la desviación estándar de la media (n=3). Las columnas con diferentes letras indican diferencia significativas a $p < 0.05$ | 40 |

LISTA DE FIGURAS (continuación)

| | | |
|----|---|----|
| 8 | Factor de condición en relación al destete temprano el 17DDE (D17) y su control (C17) en larvas de totoaba. Las barras de error representan la desviación estándar de la media (n=3). No se presenta diferencia significativa entre tratamientos | 41 |
| 9 | Longitud Estándar (mm) en relación al destete intermedio el 22 DDE (D22) y su control (C22) en larvas de totoaba. Las barras de error representan la desviación estándar de la media (n=3) | 42 |
| 10 | Peso Seco (mg) en relación al destete intermedio el 22 DDE (D22) y su control (C22) en larvas de totoaba. Las barras de error representan la desviación estándar de la media (n=3). No se presenta diferencia significativa entre tratamientos | 42 |
| 11 | Supervivencia (%) en relación al destete intermedio el 22 DDE (D22) y su control (C22) en larvas de totoaba. Las barras de error representan la desviación estándar de la media (n=3). No se presenta diferencia significativa entre tratamientos | 42 |
| 12 | Factor de condición Factor de condición en relación al destete intermedio el 22 DDE (D22) y su control (C22) en larvas de totoaba. Las barras de error representan la desviación estándar de la media (n=3). No se presenta diferencia significativa entre tratamientos | 43 |
| 13 | Longitud Estándar (mm) en relación al destete tardío el 27 DDE (D27) y su control (C27) en larvas de totoaba. Las barras de error representan la desviación estándar de la media (n=3). Las columnas con diferentes letras indican diferencia significativas a $p<0.05$ | 44 |
| 14 | Peso Seco (mg) en relación al destete tardío el 27 DDE (D27) y su control (C27) en larvas de totoaba. Las barras de error representan la desviación estándar de la media (n=3). Las columnas con diferentes letras indican diferencia significativas a $p<0.05$ | 44 |

LISTA DE FIGURAS (continuación)

| | | |
|----|---|----|
| 15 | Supervivencia (%) en relación al destete tardío el 27 DDE (D27) y su control (C27) en larvas de totoaba. Las barras de error representan la desviación estándar de la media (n=3). Las columnas con diferentes letras indican diferencia significativas a $p<0.05$ | 44 |
| 16 | Factor de condición en relación al destete tardío el 27 DDE (D27) y su control (C27) en larvas de totoaba. Las barras de error representan la desviación estándar de la media (n=3). Las columnas con diferentes letras indican diferencia significativas a $p<0.05$ | 45 |
| 17 | Longitudes estándar (mm) obtenidas al final del experimento (35 DDE), para los destetes los días 17, 22 y 27 DDE en larvas de totoaba. Las barras de error representan la desviación estándar de la media (n=3). No se presenta diferencia significativa entre tratamientos | 46 |
| 18 | Pesos secos (mg) obtenidas al final del experimento (35 DDE), para los destetes los días 17, 22 y 27 DDE en larvas de totoaba. Las barras de error representan la desviación estándar de la media (n=3). No se presenta diferencia significativa entre tratamientos | 46 |
| 19 | Supervivencias (%) obtenidas al final del experimento (35 DDE), para los destetes los días 17, 22 y 27 DDE en larvas de totoaba. Las barras de error representan la desviación estándar de la media (n=3). No se presenta diferencia significativa entre tratamientos | 47 |
| 20 | Factor de condición obtenidos al final del experimento (35 DDE), para los destetes los días 17, 22 y 27 DDE en larvas de totoaba. Las barras de error representan la desviación estándar de la media (n=3). No se presenta diferencia significativa entre tratamientos | 47 |
| 21 | Tasa de ingestión de larvas de jurel aleta amarilla en base a los diferentes tratamientos en el primer muestreo (5DDE). Las barras de error representan la desviación estándar de la media (n=3). No se presenta diferencia significativa entre tratamientos | 49 |

LISTA DE FIGURAS (continuación)

| | | |
|----|--|----|
| 22 | Tasa de ingestión de larvas de jurel aleta amarilla en base a los diferentes tratamientos en el segundo muestreo (10DDE). Las barras de error representan la desviación estándar de la media (n=3). No se presenta diferencia significativa entre tratamientos | 49 |
| 23 | Tasa de ingestión de larvas de jurel aleta amarilla en base a los diferentes tratamientos en el tercer muestreo (15DDE). Las barras de error representan la desviación estándar de la media (n=3). Las columnas con diferentes letras indican diferencia significativas a $p < 0.05$ | 50 |
| 24 | Tasa de ingestión de larvas de jurel aleta amarilla en base a los diferentes tratamientos en el cuarto muestreo (20DDE). Las barras de error representan la desviación estándar de la media (n=3). No se presenta diferencia significativa entre tratamientos | 51 |
| 25 | Curva de calibración utilizada para determinar la tasa de ingestión en base al número de fluoroesferas ingeridas por las larvas | 75 |
| 26 | Curva de calibración para determinar la cantidad de fluorescencia presente en las microesferas en base a unidades de fluoresceína | 75 |
| 27 | Curva de calibración para determinar la cantidad de fluorescencia presente en las microesferas fluorescentes | 76 |

LISTA DE TABLAS

| Tabla | | Página |
|--------------|---|---------------|
| I | Protocolo típico de transición de alimento | 26 |
| II | Composición proximal de los ingredientes de la dieta (% peso seco) | 31 |
| III | Cantidad de atractante utilizado para lograr una concentración de 10^{-3} Molar en las unidades experimentales de 500 mL. | 32 |
| IV | Cantidad de atractantes utilizados en el tratamiento Mixto para lograr una concentración de 10^{-3} Molar | 32 |
| V | Supervivencia (35DDE), Peso Seco y Longitud Estándar (LE) iniciales y finales correspondientes a las diferentes edades de destete. DE=Desviación estándar (n=3) | 39 |

I. INTRODUCCIÓN

La acuicultura es el conjunto de actividades que tienen por objeto la producción y comercialización de organismos acuáticos como micro y macroalgas, larvas y juveniles de moluscos, crustáceos y peces, controlando los ecosistemas naturales ó artificiales para su producción (Brown, 1989; Herrero *et al.*, 1991; Kawamura *et al.*, 1997). Otro de los objetivos de esta actividad es la producción en cautiverio de especies amenazadas con fines de repoblamiento en áreas naturales (True *et al.*, 1997).

En la actualidad la acuicultura es uno de los sectores de producción de alimento para consumo humano de más rápido crecimiento, con un alto potencial para generar empleos y divisas en nuestro país (Lazo, 2000; Avilés-Quevedo *et al.*, 2004).

De la producción mundial de organismos acuáticos en el 2002, la pesca represento el 69.78% del suministro de estos organismos, mientras que el 30.21 % se originó de la acuicultura. En el año 2005, la producción pesquera y acuícola mundial alcanzó los 141.6 millones de toneladas métricas (TM), siendo el cultivo de peces el 56.6 % de la producción con 80 millones de TM. En particular, la maricultura ha crecido a una tasa anual del 15 % desde 1984, siendo la producción de peces marinos una actividad con un gran potencial económico en relación a los niveles de producción obtenidos. Por ejemplo, en 1998 la producción mundial representó el 1.98 % de la producción total, sin embargo su valor económico fue de 6.47 % (FAO, 2004; FAO, 2006).

En el cultivo de peces marinos, el periodo larval es considerado uno de los principales cuellos de botella, tanto en las unidades experimentales como en las de producción comercial, debido a las altas mortalidades que se presentan en esta etapa, oscilando entre el 70 al 95 % (Alarcón *et al.*, 2002; Lazo, 2000; Avilés-Quevedo *et al.*, 2004). El éxito del cultivo de peces marinos depende en gran parte

del abastecimiento adecuado de juveniles para su engorda y del desarrollo de dietas elaboradas a partir de ingredientes de bajo costo y con valores nutricionales altos. Se ha estimado que el alimento, por sí sólo, representa entre el 40 y 60 % de los gastos de producción totales de una unidad de producción intensiva de organismos acuáticos siendo esto un factor determinante en la rentabilidad de estas unidades (Anderson *et al.*, 1993).

En los laboratorios de producción de peces marinos, se utiliza obligadamente alimento vivo como *Artemia* y/o rotíferos para alimentar a las larvas, no obstante, el alimento vivo es deficiente en ciertos nutrientes esenciales como ácidos grasos altamente insaturados (HUFA's por sus siglas en inglés). Además, su producción es costosa, impredecible y laboriosa (Kolkovski, 2001). Es por esto, que durante las últimas tres décadas se han realizado grandes esfuerzos en el desarrollo de microdietas¹ para reemplazar el alimento vivo en la etapa larvaria de peces marinos. El reemplazo de alimento vivo a microdieta es conocido como “destete”. A la fecha se han logrado grandes avances en la reducción del uso de alimento vivo en el cultivo larvario, lográndose destetes exitosos en etapas cada vez más tempranas; sin embargo, no se ha llegado a sustituir por completo el uso de alimento vivo en la mayoría de las especies cultivadas a nivel comercial (Jones *et al.* 1993; Kolkovski, 2001; Koven *et al.*, 2002; Zambonino-Infante y Cahu, 2001).

La eficiencia en la captura del alimento (vivo ó formulado) por las larvas es afectado por factores externos como las condiciones del cultivo e internos que dependen de la fisiología de los organismos (Kolkovski *et al.*, 2009; Koven *et al.*, 2002). Los procesos de búsqueda, identificación e ingestión del alimento se ven influenciados por factores visuales en donde el color, forma, tamaño y movilidad del alimento son importantes para su detección. Asimismo, su detección depende de factores químicos en donde intervienen estímulos olfatorios a nivel molecular (Kolkovski *et al.*, 1997). Algunas sustancias químicas secretadas por el alimento

¹ Microdietas: Se refiere en la literatura como la dieta formulada utilizada para alimentar a las larvas de peces en la fase de destete. Generalmente tienen un tamaño de entre 150-800 µm.

vivo funcionan como “atractantes”, ya que al ser identificadas por las larvas, estimulan una respuesta alimentaria (Kolkovski, 2001; Kolkovski *et al.*, 1997).

En los sistemas acuáticos, los compuestos con características atractantes, necesitan ser solubles en agua para poder propagarse de una manera adecuada en el medio y puedan ser detectados por los receptores específicos de los organismos. Por lo general, estos compuestos estimulantes, son de bajo peso molecular, tales como los aminoácidos, esteroides, azúcares y nucleótidos (Takeda y Takii, 1992; Lamb, 2001; Rust, 2002).

Los grandes costos de producción de larvas de peces marinos, pueden ser disminuidos al optimizar las tasas de ingestión de las microdietas durante el destete, mediante la incorporación de sustancias con efecto atractante en las dietas, que estimulen la ingesta del alimento formulado y permitan realizar un destete más exitoso (Saguira, 2000).

El objetivo de este trabajo fue (1) evaluar el éxito del destete progresivo en larvas de totoaba (*Totoaba macdonaldi*) de diferentes edades, utilizando el crecimiento y la supervivencia como variables de respuesta y (2) evaluar el efecto del uso de atractantes en las microdietas sobre las tasas de ingestión en larvas de Jurel cola amarilla (*S. lalandi dorsalis*); estos objetivos se plantean con la finalidad de generar conocimientos para optimizar el uso de microdietas en cultivos de larvas de peces marinos.

II. Error! Bookmark not defined.**ANTECEDENTES**

II.1. *Totoaba macdonaldi*: biología y explotación

La totoaba (*T. macdonaldi*) es un pez endémico del Golfo de California, México, que alcanza tallas cercanas a los dos metros de longitud (Berdegué, 1955) y pesos superiores a los 135 kg (Cannon, 1966). Su distribución natural se extiende desde la desembocadura del río Colorado hasta Mulegé, B.C.S., en la costa occidental del Golfo de California, hasta la desembocadura del río Fuerte, Sinaloa, en la costa oriental del Golfo (Ruíz-Durá, 1980; Talamás, 2001).

La pesquería de la totoaba se caracterizó por un acelerado crecimiento, siendo su industrialización uno de los episodios más interesantes en la historia de las pesquerías en nuestro país. A principios de 1900 se exportaba su vejiga gaseosa a oriente para ser utilizado como principal ingrediente en una sopa gourmet (Berdegué 1956; Chute, 1928).

El primer registro de exportación de carne de totoaba hacia los Estados Unidos data de 1923, siendo de apenas 34 kg, mientras que para 1924 el registro de exportaciones fue de 77 toneladas. Para 1925 las exportaciones prácticamente se cuadruplicaron y de ahí en adelante la producción comenzó a duplicarse año con año (Chute, 1928). Para 1942 la captura alcanzó un máximo de 2,261 toneladas, posteriormente, sin importar el incremento en el esfuerzo pesquero, la producción anual fluctuó en forma errática hasta llegar a sólo 58 toneladas en 1975 (Flanagan y Hendrickson, 1976).

Ese mismo año, el gobierno mexicano declaró una moratoria indefinida a la pesca de la Totoaba (Diario Oficial de la Federación, 1975) y se le consideró amenazada por sobrepesca en el CITES (Convention on International Trade in Endangered Species 1976; y la Norma Oficial Mexicana, NOM-ECOL-059-94).

Talamás (2001), citando a Berdegué (1956), menciona que entre los factores que estaban acelerando la sobreexplotación y posible extinción de la totoaba se encuentran:

- Un área de distribución limitada de la especie, pues se encuentra únicamente en el Golfo de California, en comparación con la gran mayoría de las especies de la familia Sciaenidae que se distribuyen a lo largo de las costas de varios países del Pacífico Oriental y otros mares (Fischer *et al.* 1995).
- La concentración alta de adultos en las reducidas áreas de reproducción, lo que facilitó año tras año la captura de un gran número de ejemplares grávidos.
- El uso frecuente de redes de arrastre para la pesca del camarón en las aguas cercanas a la desembocadura del río Colorado, que ocasionaron la muerte de grandes cantidades de ejemplares juveniles.
- El efecto negativo que tuvo en las zonas de crianza del alto Golfo de California, la paulatina disminución del caudal de agua dulce aportada anualmente por el río Colorado, ocasionado por la construcción de la presa Hoover en 1935 y la presa Glen Canyon en 1960 (Lavín y Sánchez, 1999).

Aunque se han postulado las causas probables que afectan a las poblaciones de este importante recurso, la información que existe sobre la totoaba sigue siendo muy limitada. Sin embargo, existe trabajos sobre su pesquería (Berdegué, 1955), ecología y biología (Flanagan, y Hendrickson, 1976; Cisneros-Mata *et al.*, 1995). Asimismo, se cuenta con estudios sobre su desarrollo embrionario (Morales-Ortiz, 1999), desarrollo larval (Sandoval-Garibaldi, 2001) y requerimientos nutricionales. Sobre esto último, se ha investigado el efecto de diferentes niveles de ácidos grasos, dietas isoprotéicas, niveles de alimentación, etc. (Rodríguez, 2003; Solorzano, 2006; Vizcaíno, 2008, Villareal *et al.*, 2010).

Actualmente la Unidad de Biotecnología en Piscicultura de la Facultad de Ciencias Marinas de la Universidad Autónoma de Baja California, participa en

programas de repoblamiento con juveniles obtenidos mediante el desove de organismos mantenidos en cautiverio (True *et al.*, 1997, 2001). Además, se encuentra en proceso la obtención de permisos para lograr la comercialización de juveniles de totoaba procedentes de cultivo (comunicación personal Dr. Benjamín Barón Sevilla, CICESE).

II.2. Jurel Cola Amarilla: Biología y Cultivo

El Jurel cola amarilla (*S. lalandi*), se agrupa en la clase Osteichthies, orden Perciformes y familia Carangidae. Su distribución es mundial, encontrándose varias subespecies. El jurel cola amarilla “Yellowtail Kingfish Hiramasa” (*S. lalandi*) se encuentra en aguas frías del Océano Indo-Pacífico: Sudáfrica, Japón, Australia, Nueva Zelanda y Chile. De igual manera, el jurel cola amarilla del Pacífico, “California Yellowtail” (*S. lalandi dorsalis*) se encuentra en el Océano Pacífico Oriental: desde Columbia Británica, Canadá, hasta Baja California Sur, México (Poortenaar *et al.*, 2003; Avilés-Quevedo *et al.*, 2004).

En México, la especie *S. lalandi dorsalis*, es conocida como jurel de cola amarilla del Pacífico, esmedregal ó jurel de castilla. Se presenta en las costas de la Península de Baja California y en el golfo de Cortés, convirtiéndose en un buen candidato para la acuicultura, por su excelente crecimiento, alta demanda, pero sobre todo por los altos precios que alcanza su carne en el mercado internacional (Avilés-Quevedo *et al.*, 2004)

Los jureles pueden llegar a medir 250 cm de longitud con un peso de 70 kg, las hembras son ligeramente más grandes que los machos, pero ambos poseen una tasa de crecimiento rápido oscilando entre los 2 a 3 kg por año (Nakada, 2000; Poortenaar, 2003). El jurel cola amarilla es un pez pelágico que se encuentra en aguas templadas (18 – 24 °C). Es carnívoro por excelencia ya que se alimenta de pequeños peces como la macarela, sardina, anchoveta, calamar y crustáceos (Poortenaar, 2003).

El cultivo del jurel aleta amarilla Japonés (*S. quinqueradiata*) inició en Japón en la década de 1930 (Ikenoue y Kafuku, 1992). En la actualidad, Japón produce entre 140,000 y 160,000 toneladas anuales a través de la acuicultura, lo cual representa más de cuatro veces la producción pesquera de esta especie en ese país (Nakada, 2000). El interés por el cultivo del jurel se ha expandido a otros países incluyendo Australia, Nueva Zelanda, Corea, España, México y Ecuador.

La principal modalidad de cultivo del jurel es en jaulas flotantes, la cual representa más de tres cuartos del total, otras modalidades de cultivo son el de encierros con red fija y el cultivo en estanques (Montes, 2007).

Entre las principales ventajas que presenta el cultivo de jurel cola amarilla están la gran facilidad con la que se adapta al cautiverio, tiene una gran demanda, pero sobre todo presenta tasas de crecimiento relativamente rápidos, logrando alcanzar un crecimiento muy parecido al de *S. quinqueradiata* (2.5 kg por año), siendo mucho mayor al de otras especies de jureles como *S. dumerili* que sólo alcanzan 1 kg por año (Poortenaar *et al.*, 2003). Otro aspecto que es importante para su potencial aprovechamiento, es que el jurel cola amarilla es una especie que se distribuye y reproduce a lo largo de los litorales del Pacífico mexicano, lo que favorece su captura tanto en estadio post-larval como juvenil, para posteriormente crecerlos y engordarlos en jaulas flotantes (Poortenaar *et al.*, 2003; Avilés-Quevedo *et al.*, 2004; Kolkovski y Sakakura, 2004). El cultivo de jurel, aún cuando se encuentra en fase desarrollo, ya representa la segunda industria más importante de cultivo de peces marinos en México, superada únicamente por la industria atunera (Montes, 2007). El jurel es una especie potencial para el cultivo de peces marinos en México, con las mejores expectativas de crecimiento (Lazo *et al.*, 2007).

Los estudios relacionados con la biología del género *Seriola* sp son diversos, entre los cuales destacan, los estudios realizados en las diferentes etapas reproductivas de *S. dumerilii* (Mandich *et al.*, 2004), hábitos alimenticios de *S. dumerilii* y *S. rivoliana* (Manooch *et al.* 1983), tecnología de cultivo del género

Seriola, tanto en el Pacífico como en el Atlántico, (Arredondo Figueroa *et al.* 1994; Benetti, 1997; Nakada, 2000; Skaramuca *et al.*, 2001; Poortenaar *et al.*, 2003; Avilés-Quevedo *et al.*, 2004; Muashita *et al.*, 2005). Sin embargo, los estudios realizados en relación a aspectos nutricionales del jurel cola amarilla (*S. lalandi*) son relativamente pocos. Chen y colaboradores (2006) caracterizaron y describieron la ontogenia del sistema digestivo en larvas y de algunas enzimas digestivas (Chen *et al.*, 2006). Trabajos recientes han logrado caracterizar el perfil enzimático (Montes, 2007), y evaluar diferentes fuentes proteicas en base a su digestibilidad (Lazo *et al.*, 2007; García-Gómez, 2009).

II.3. La alimentación en las etapas larvarias de peces marinos

El cultivo larvario de peces marinos se basa en el empleo de alimento vivo, como el rotífero *Brachionus plicatilis* y el crustáceo branquiópodo *Artemia* spp. (Burke *et al.* 1999; Hamre *et al.* 2002; Evjemo *et al.* 2003). No obstante, se ha observado que los alimentos vivos tienen la desventaja de un alto costo de producción, variaciones frecuentes de su calidad nutricional, son naturalmente deficientes en macro y micronutrientes, en particular HUFA's n-3, y no logran satisfacer los requerimientos nutricionales de algunas larvas de peces (García-Ortega, 2003; Hamre *et al.*, 2002; Takeuchi *et al.*, 2003). Además, el tamaño de las presas deja de ser adecuado para las larvas en las etapas tardías (Burke *et al.*, 1999). A pesar de las desventajas que conlleva el uso de alimentos vivos para la alimentación larvaria de peces, a la fecha no se han podido reemplazar por alimentos formulados y siguen siendo imprescindibles en las etapas tempranas del cultivo (Martínez, 2007)

Como se mencionó anteriormente, tanto la *Artemia* como los rotíferos son naturalmente deficientes en ciertos nutrientes esenciales para los peces marinos, por lo que son enriquecidos con emulsiones nutrimentales para cubrir los requerimientos nutricionales de las larvas de los peces marinos. Una de las

alternativas al uso del alimento vivo es el uso de alimentos formulados (microdietas) que ha dado resultados variables en cuanto al reemplazo total del alimento vivo.

El empleo de alimentos formulados en la larvicultura de peces marinos se inicia mediante el reemplazo gradual del alimento vivo en un proceso conocido como “**destete**”, sin embargo dependiendo de la especie y el grado de desarrollo de la larva se pueden utilizar diversas estrategias:

- Destete directo: la microdieta se suministra en cuanto comienza la alimentación exógena. Estrategia usada en peces de agua dulce y salmónidos.
- Destete tardío: se alimenta con alimento artificial una vez que la larva presenta un estómago funcional, entre el primer y segundo mes de vida.
- Destete progresivo: al alimento artificial y el alimento vivo se suministran en conjunto, modificando las proporciones conforme pasa el tiempo hasta que la larva se alimenta únicamente de alimento formulado. Esta representa la estrategia más exitosa (Lazo *et al.*, 2000).

Por ejemplo, el destete tardío utilizando microdietas compuestas, es la estrategia que mejores resultados ha generado en el cultivo larvario del lenguado de California (*Paralichthys californicus*), al sustituir gradualmente los nauplios de *Artemia* a partir de 36 días después de la eclosión (DDE) (Lazo, 2000; Muguet, 2010).

El destete de las larvas en los peces marinos es una etapa crítica del cultivo por lo que la dieta usada debe ser de óptima calidad nutricional y alimentaria (Hamre *et al.*, 2002). Para que una dieta sea adecuada debe cubrir los siguientes requisitos (Lazo *et al.* 2000; Valverde, 2002; Cahu y Zambonino-Infante, 2001; Civera-Cerecedo *et al.*, 2004):

- Cubrir los requerimientos nutricionales de las larvas.
- Las partículas deben poseer un tamaño adecuado que facilite su detección e ingestión.
- Las partículas deben ser estables en el agua, palatables y con una apariencia adecuada.
- Las partículas alimenticias deben ser homogéneas, cada una debe contener la misma cantidad de nutrientes y deben encontrarse en densidades adecuadas en la columna de agua.
- Las dietas deben ser formuladas con ingredientes altamente digeribles y que respondan a las variaciones ontogénicas enzimáticas específicas en las etapas larvarias de peces marinos.
- Además, una vez ingeridas deben de estimular adecuadamente la secreción de las enzimas digestivas y los productos de la digestión deben ser de fácil absorción por los enterocitos del intestino.

II.4. Destete y co-alimentación

Un factor importante que afecta la aceptación de una microdieta por parte de la larva, es el proceso de destete, lo que se verá reflejado en el crecimiento y supervivencia de las larvas. En el pasado, el destete temprano originaba larvas con un crecimiento pobre y un incremento en deformidades esqueléticas, además de producir larvas con un nivel nutricional inferior comparadas con las larvas alimentadas con alimento vivo (Cahu y Zambonino Infante, 2001).

Los avances que se han tenido a la fecha en el conocimiento de la fisiología digestiva, los requerimientos nutricionales y el proceso alimenticio de las larvas han permitido desarrollar formulaciones de microdietas que han reducido considerablemente el período pre-destete, permitiendo el desarrollo de dietas específicas en algunas especies que se pueden utilizar exitosamente en cuanto

las larvas abren la boca e inician su alimentación exógena (Cahu y Zambonino Infante, 2001).

De los diferentes protocolos de destete utilizados para cultivar larvas de peces marinos, aquellos que emplean un período de “co-alimentación” de dietas formuladas y presas vivas, han logrado reducciones importantes en el tiempo en el que se puede iniciar el destete (Roselund *et al.*, 1997; Koven *et al.*, 2001; Curnow *et al.*, 2006;) (Figura 1).

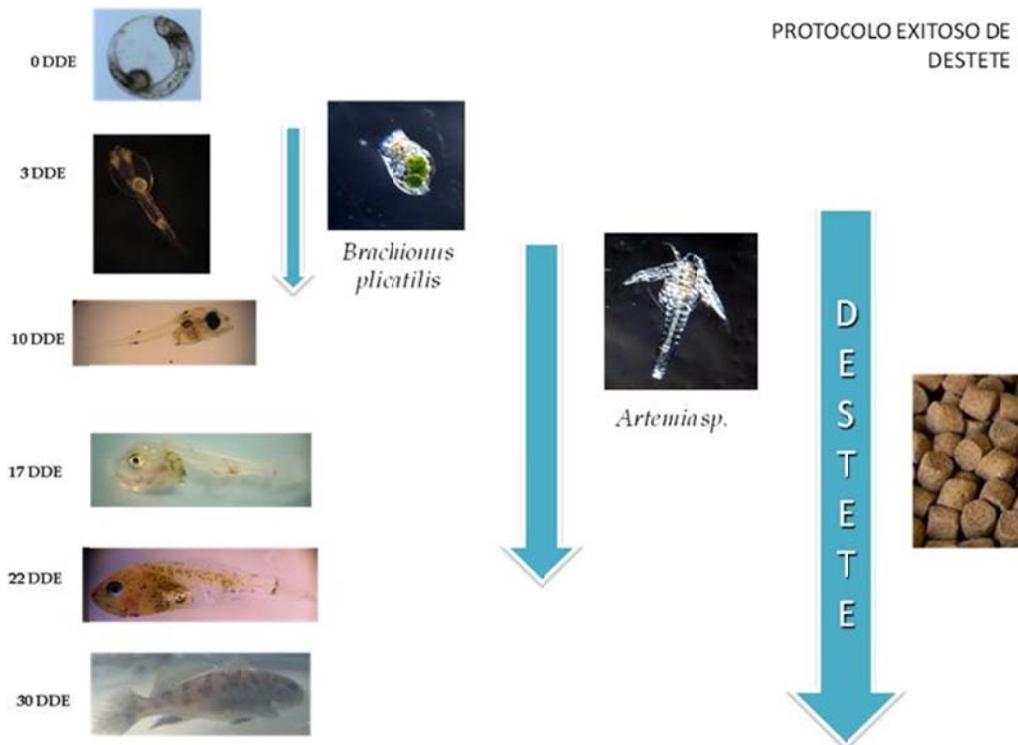


Figura 1.- Protocolo exitoso de destete en base al tipo de alimento proporcionado a las larvas en relación a los días después de la eclosión (DDE) y su desarrollo.

II.5. Requerimientos nutricionales de las larvas

Uno de los aspectos más complicados en la nutrición de peces marinos, es definir claramente los requerimientos nutricionales de las larvas, para así poder formular microdietas adecuadas a su capacidad digestiva y sus requerimientos, debido a que durante esta etapa se presenta una mayor demanda de nutrientes,

principalmente proteínas, que los requeridos por los juveniles y adultos. Esto se debe a que se deben satisfacer los requerimientos por energía y nutrientes necesarios para lograr de una manera exitosa los cambios morfológicos y fisiológicos que ocurren durante el proceso de metamorfosis (Kolkovski *et al.*, 1997; Lazo, 2000).

Es por esto que se deben desarrollar microdietas que sean capaces de cubrir los requerimientos de las larvas, sin embargo, la limitada información sobre nutrición larval relacionada a sus requerimientos, ha impedido el desarrollo de una microdieta efectiva. Sin embargo, la cantidad de nutrientes que logra ingerir y absorber una larva, pueden verse afectados por factores externos como la lixiviación ó disponibilidad de nutrientes en la dieta. Así mismo, el tipo de alimento e incluso la tecnología de producción de alimento afectan de igual manera la disponibilidad de nutrientes, por lo que es necesario que los factores anteriores se tengan en consideración al momento de formular y diseñar la dieta y estrategia de alimentación a usar en el cultivo larvario.

Debido a la dificultad para evaluar los requerimientos nutricionales de las larvas de peces marinos, se han utilizado algunas variables de respuesta capaces de producir información con respecto al estado y condición nutricional de las larvas de peces marinos. A continuación se enlistan algunas (Kolkovski *et al.*, 2009):

- Tasa de crecimiento: afectada notablemente por la presencia/ausencia de algunos nutrientes.
- Tasa de supervivencia: un parámetro determinante por la presencia de ciertos nutrientes.
- Resistencia al estrés y/o condiciones adversas (temperaturas y/o salinidades altas).
- Composición bioquímica de las larvas.

II.6. Ontogenia y Capacidad digestiva en larvas de peces marinos

El desarrollo de microdietas adecuadas para reemplazar el alimento vivo en el cultivo de larvas de peces marinos, requiere un conocimiento profundo de los procesos digestivos que ocurren durante la ontogenia de las larvas. Al momento de la eclosión, las larvas carecen de estómago diferenciado, además presentan un páncreas, vesícula biliar e hígado inmaduros lo que se refleja en bajas tasas de secreción enzimática y una capacidad digestiva limitada (Kolkovski *et al.*, 2009).

La actividad enzimática tiende a intensificarse con la edad, longitud y tipo de alimento (Izquierdo *et al.*, 2000; Zambonino-Infante y Cahu, 2001; Lazo *et al.*, 2007). Dicha actividad enzimática puede asociarse de una manera directa con el estado de madurez del tracto digestivo (Valverde, 2002)

Además, el empleo de ingredientes altamente digeribles en la elaboración de microdietas, incrementa los niveles de secreción enzimática, promoviendo una mejor asimilación de los nutrientes, lo que se refleja en un mejor desarrollo y crecimiento larvario (Cahu y Zambonino-Infante, 1994; Oliva-Teles *et al.*, 1999; Kolkovski y Tandler, 1997; Lazo, 2000; Martínez, 2007).

El fracaso en la sustitución de alimento vivo por microdietas se ha atribuido históricamente a la presencia de un sistema digestivo inmaduro en el momento de la eclosión y consecuentemente en los procesos digestivos (Holt, 1993). Sin embargo, Lazo *et al.* (2000) mencionan que la falta de éxito en un destete no se puede atribuir únicamente a este factor, ya que un mal manejo en la transición de alimento vivo a formulado se puede ver reflejado en bajas tasas de ingestión de la microdietas. Además, el alimentar a las larvas de peces marinos con microdietas nutricionalmente deficientes e inadecuadas, puede interrumpir el proceso normal de maduración del sistema digestivo (Lazo *et al.*, 2000). Por lo tanto, estos factores, deben ser tomados en cuenta al momento de desarrollar una microdieta para evitar un fracaso en el proceso de destete, generando bajos rendimientos al final del cultivo (Bengtson, 1993).

Investigaciones recientes, han reportado que las larvas de totoaba (*Totoaba macdonaldi*) cuentan con un tracto digestivo relativamente bien diferenciado al momento de la primera alimentación exógena (3 DDE) con un intestino, páncreas e hígado bien diferenciados. A partir de los 16 DDE, se empieza a detectar la producción de pepsina relacionada con el inicio de la formación de las glándulas gástricas en el estómago incipiente. Sin embargo, hasta los 24 DDE se observa un estómago completamente diferenciado y funcional, indicando la presencia de un tracto digestivo maduro (Valverde, 2002; Galaviz *et al.*, 2010). Con base en estos estudios se puede caracterizar la ontogenia del tracto digestivo en las larvas de totoaba en cuatro etapas principales; la inicial (< 3 DDE), la temprana (4 a los 17 DDE), intermedia (17- 24 DDE) y madura (> 24 DDE).

II.7. Identificación e ingesta del alimento

II.7.1. Quimiorrecepción

La quimiorrecepción en peces y el efecto de los estimulantes químicos en el comportamiento alimenticio, han sido objeto de investigación desde hace más de 100 años (Lamb, 2001). Grant (1974), define el proceso de quimiorrecepción de organismos marinos como: “La estimulación de las células receptoras especializadas, provocada por la detección de pequeños cambios en la composición química del ambiente debido a sustancias volátiles ó solubles”.

En los peces, el proceso de alimentación (Figura 2) está determinado por la estimulación de diferentes órganos sensoriales (quimiorreceptores), que darán origen a una serie de pasos de van desde la detección hasta la ingestión de la partícula (Kolkovski *et al.*, 2009): A continuación se describe el marco conceptual del proceso de alimentación según Kolkovski *et al.*, (2009).

- a. Reacción general no específica, que comienza con los movimientos de búsqueda por la estimulación química y/o eléctrica.
- b. Identificación de la partícula de alimento mediada por estímulos químicos.
- c. Identificación cercana de la partícula de alimento, se involucran estímulos químicos y visuales.
- d. Palatabilidad y/o ingesta de la partícula de alimento, estímulos químicos (papilas gustativas).

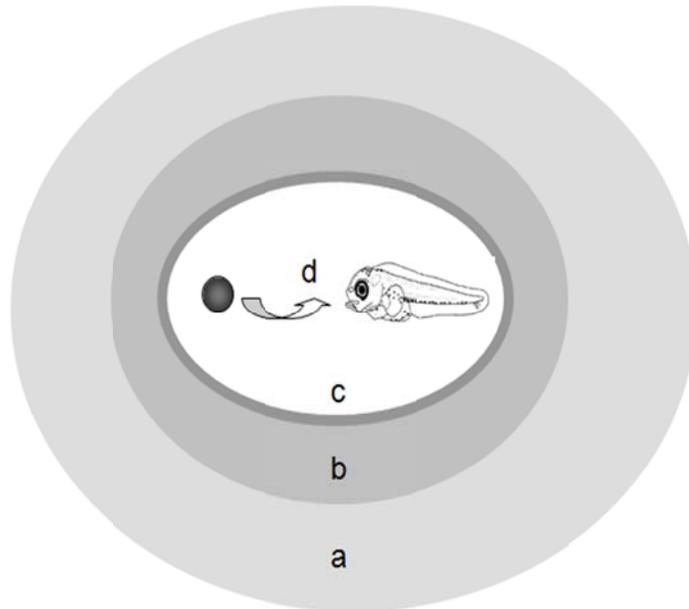


Figura 2. Proceso de alimentación: (a) reacción general no específica, comienza la búsqueda de alimento – estímulos químicos y eléctricos; (b) identificación y localización de la partícula de alimento – estímulos químicos; (c) identificación cercana de la partícula de alimento – estímulos químicos y visuales; (d) palatabilidad /ingesta – estímulos químicos (papilas gustativas) (Tomado de Kolkovski *et al.*, 2009).

Varios factores físicos, químicos y biológicos influyen en la aceptabilidad del alimento, entre los que se pueden encontrar aspectos propios del alimento (movimiento, tamaño, forma y color), factores de atracción de rango amplio (olfato y propiedades electroquímicas), factores de atracción de rango corto (textura, sabor, a veces propiedades electroquímicas) y las condiciones ambientales y de cultivo (luz, temperatura, salinidad, calidad del agua, corriente, color del tanque) (Takeda y Takii, 1992; Kolkovski *et al.*, 2009). Por lo tanto, el manejo apropiado de

estos factores, puede ser una causa determinante en el aumento de las tasas de ingestión por parte de las larvas.

La quimiorrecepción es determinante para la alimentación de las larvas durante las primeras etapas de desarrollo,

II.7.2. Órganos sensoriales

Los peces teleósteos poseen varios sistemas de quimiorrecepción, incluyendo el gusto, olfato y las células quimiorreceptoras aisladas. Se han logrado grandes avances intentando elucidar los roles que juega cada uno de estos sistemas sensoriales, pero aun es confuso, ya que por lo general cada sistema responde de manera diferente a los estímulos químicos presentes en el agua, pero pueden responder de una manera similar dependiendo de la especie en estudio (Grant, 1974; Lamb, 2001; Rust, 2002).

A la fecha se sugiere que el olfato y las células quimiorreceptoras aisladas, participan principalmente en los sistemas de comunicación de los comportamientos sociales (i.e. comunicación intra e interespecíficas). Mientras que el sistema gustativo participa principalmente en los procesos de alimentación, i.e., ingesta de alimento, así como en el rechazo de sustancias tóxicas (Grant, 1974; Rust, 2002).

II.7.2.1. Sentido del gusto

El gusto es un sentido general en los vertebrados, que comparte características similares tales como la vía de entrada de los estímulos al sistema nervioso central mediante las fibras sensitivas de los nervios facial, vago y glossofaríngeo. Además de compartir las zonas donde se procesan los estímulos gustativos en el tronco cerebral y bulbo raquídeo (Wulliman, 1997; Lamb, 2001).

Los estímulos químicos son detectados por las células especializadas, capaces de detectar los cambios en el ambiente similares a las papilas gustativas. En los peces teleósteos, dichas papilas no sólo se encuentran en la cavidad bucal, sino que también se localizan en el epitelio de la cabeza y repartidas a lo largo del cuerpo, en donde para algunas especies (ciprínidos) se han estimado la presencia de varios cientos por cada milímetro cuadrado de tejido epitelial (Lamb, 2001; Rust, 2002).

Las papilas gustativas son células de forma alargada que se orientan de manera perpendicular a la superficie epitelial, teniendo micro vellosidades de crecimiento apical (Reutter y Witt, 1993). Las papilas se dividen en varios tipos dependiendo de sus características citológicas (Reutter y Witt, 1993):

- Células claras: sirven como receptores
- Células oscuras: brindan soporte (posibles receptores)
- Células basales: modifican y transfieren el estímulo a los diferentes nervios sensoriales.

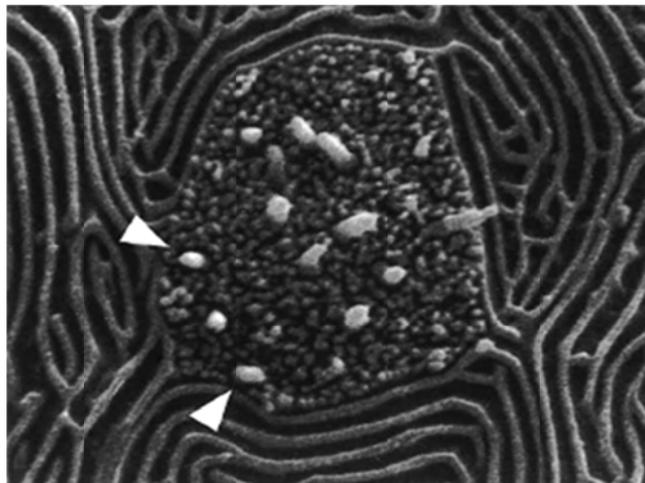


Figura 3.- Microscopia Electrónica de Barrido (MEB) de un poro apical de una papila gustativa localizada en el epitelio craneal de una carpa africana (*Phreathichthys andruzzi*) en donde se observan las células claras (flechas) y oscuras (el tamaño del poro es de 5 μm \times 7 μm) (Tomado de Lamb, 2001).

II.7.2.2. Sentido del olfato

El sentido del olfato de los peces se encuentra entre los más desarrollados de los vertebrados. Tanto estudios de campo como de laboratorio han destacado la gran sensibilidad que presentan a una serie de estímulos (olores) que ocurren normalmente en el medio acuático, como sustancias liberadas por el alimento vivo (Yamamoto y Ueda, 1979; Nevitt, 1991).

En los peces teleósteos, las moléculas odorantes son detectadas en la mucosa del epitelio de la cavidad nasal, la cual está tapizada de células receptoras y microvellosidades capaces de transmitir el estímulo a las fibras del nervio olfatorio. El tejido epitelial forma estructuras como rosetas, cuya finalidad es aumentar la superficie receptiva dentro de la cavidad nasal. Estas estructuras olfativas, mantienen una comunicación abierta con el medio ambiente por medio de las narinas que sirven como vía de intercambio acuoso. Mientras que en el sistema nervioso central, las fibras del nervio olfativo que se originan en las células de la mucosa nasal, se unen al bulbo olfativo estableciendo un contacto sináptico con las neuronas de este (Grant y Mackie, 1974; Hara 1975; Yamamoto y Ueda 1979; Nevitt, 1991).

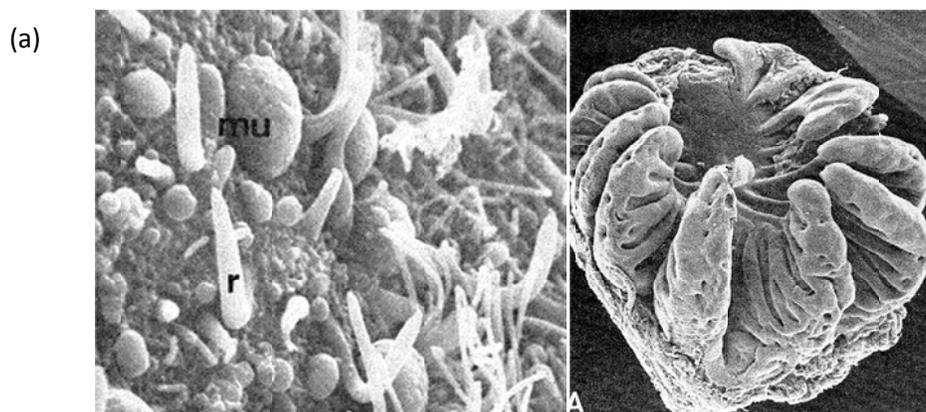


Figura 4.- (a) MEB del tejido epitelial de la cavidad nasal del salmón chien (*Oncorhynchus keta*), donde se observan las células receptoras (mu) y las microvellosidades (r). (b) MEB de una roseta olfativa de salmón chien (*Oncorhynchus keta*) (Tomado de Yamamoto y Ueda 1979).

II.7.3. Comportamiento alimentario de larvas de peces marinos

Algunas sustancias como amino ácidos, nucleótidos y bases de amonio, son liberadas por los organismos de los cuales se alimentan las larvas y son potentes inductores del comportamiento alimentario de larvas de peces marinos y dulceacuícolas (Knusten, 1992; Carr *et al.*, 1996).

Por lo general las presas de las cuales se alimentan las larvas se agregan en grandes concentraciones), en donde dichas sustancias se encuentran presentes, producto de los procesos metabólicos y/o liberados al ser depredados por otros organismos. Kolkovski *et al.* (1997) identificaron algunas de éstas sustancias presentes en el agua de cultivo de *Artemia* y al añadir algunas gotas del agua del cultivo en el tanque de larvas, observaron cómo se iniciaba inmediatamente un comportamiento alimentario por parte de estas.

Entre los compuestos que desencadenaron una mayor reacción alimentaria en las larvas se encuentran los aminoácidos como la alanina y serina; los nucleótidos como la inosina 5'-monofosfato (IMF) y algunas sales cuaternarias de amonio como la betaína (Carr *et al.*, 1996). Una manera práctica de incrementar la tasa de ingestión en las microdietas ha sido mediante la incorporación de estas sustancias al alimento (como extractos o hidrolizadas).

Kolkovski *et al.* (1997), mencionan que la dependencia de un sistema a base de estímulos químicos rudimentarios por parte de la larva, disminuya probablemente conforme la larva desarrolla sus habilidades de caza, de ahí la importancia de estimular de una manera apropiada a los quimiorreceptores durante las primeras etapas de ontogenia larval.

II.7.3.1. Incorporación de atractantes en el uso de microdietas en el cultivo larvario

Existen varias maneras de incorporar los atractantes en el uso de microdietas en un sistema de cultivo larval (Kolkovski *et al.*, 2009) y generar la respuesta alimentaria:

- Adición directa de los atractantes al agua de cultivo, que aunque se utilizan grandes cantidades del compuesto, la concentración del atractante se mantiene constante.
- Cubriendo las partículas de alimento con el atractante, lo que permite lixiviación de estos compuestos, favoreciendo la palatabilidad del alimento y facilitando la identificación de la partícula de alimento.
- Incorporándolos como parte de los ingredientes de la dieta, por lo general se desconoce la tasa de lixiviación (depende del tipo de microdieta), sin embargo, solo una cantidad muy pequeña del atractante es requerido y se incrementa la digestión y la asimilación

III. HIPÓTESIS

- Con base en estudios previos de la ontogenia del sistema digestivo de las larvas de totoaba (*T. macdonaldi*) y los protocolos de destete de otras especies de Sciaenidos, se tendrá un buen crecimiento y supervivencia de las larvas de totoaba (*T. macdonaldi*) al realizar el destete desde los 17 DDE.
- El uso de atractantes aumentará significativamente las tasa de ingestión de microdietas en larvas de jurel cola amarilla (*S. lalandi*) y la combinación de estos tendrá un mayor efecto que el uso de estos por separado.

IV. OBJETIVOS

IV.1. Objetivos Generales

- Evaluar el éxito del destete progresivo en diferentes edades en larvas de totoaba (*T. macdonaldi*).
- Evaluar el efecto de algunos atrayentes sobre la tasa de ingestión de una microdieta en larvas del jurel cola amarilla (*S. lalandi*)

IV.2. Objetivos Específicos

- Evaluar el éxito del destete progresivo a los 17, 22 y 27 días después de la eclosión (DDE), utilizando el crecimiento y la supervivencia de las larvas de totoaba (*T. macdonaldi*) como variables de respuesta.
- Estandarizar una técnica para cuantificar las tasas de ingestión de microdietas utilizando fluoroesferas.
- Evaluar el efecto de la betaína, alanina, serina y la inosina 5'-monofosfato adicionadas independientemente a las microdietas sobre las tasas de ingestión.
- Evaluar el efecto de la combinación de betaína, alanina, serina e inosina 5'-monofosfato en la misma dieta sobre la tasa de ingestión.

V. MATERIALES Y METODOLOGIA

V.1. Efecto de la edad en el éxito del destete en larvas de totoaba (*T. macdonaldi*).

V.1.1. Diseño experimental

Para caracterizar el efecto de la edad al momento del destete sobre el crecimiento y la supervivencia, se evaluaron 3 edades de larvas;

- Destete temprano (17 DDE).
- Destete intermedio (22 DDE)
- Destete tardío (27 DDE)

Las edades fueron seleccionadas con base en el grado de desarrollo de las larvas y el protocolo de alimentación típicamente utilizado (True *et al.*, 1997). Por ejemplo, las larvas del tratamiento de destete temprano, 17 DDE (D17) se habían alimentado únicamente con rotíferos y no tenían el estómago funcional (Valverde *et al.*, 2002; Galaviz *et al.*, 2010). Las larvas correspondientes al tratamiento del destete del 22DDE (D22) habían sufrido la transición de rotíferos a *Artemia* y el estómago iniciaba su madurez funcional, mientras que las larvas correspondientes al destete del 27 DDE (D27) se alimentaban ya exclusivamente con *Artemia* y su estómago era plenamente funcional (Valverde, 2002; Galaviz *et al.*, 2010). Para cada edad de destete evaluada, se utilizó un tratamiento Control (siendo C17 el tratamiento control para 17DDE, C22 el tratamiento control para 22DDE y C27 el tratamiento control para 27DDE). Los controles fueron alimentados conforme al protocolo de alimentación con alimento vivo que se describe abajo en la sección de cultivo larvario.

V.1.2. Cultivo larval de totoaba

Se obtuvieron huevos fértiles de totoaba (*T. macdonaldi*) provenientes de desoves de reproductores mantenidos en cautiverio en las instalaciones de la Unidad de Biotecnología en Piscicultura de la Universidad Autónoma de Baja California (UABC). Los huevos fueron transferidos en agua de mar dentro de bolsas de plástico a 20 °C a las instalaciones del Laboratorio de Cultivo de Peces Marinos del Departamento de Acuicultura del Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada (CICESE; Ensenada, B.C.).

Los huevos viables fueron separados del resto, mediante la flotabilidad positiva que presentan, retirándolos cuidadosamente con una pipeta de 10 mL de la capa superficial de la columna de agua y posteriormente desinfectados con formalina al 37 % a una concentración de 0.10 mL L⁻¹ durante una hora.

Posteriormente los huevos fueron transportados al Laboratorio de Cultivo de Larvas para ser sembrados a una densidad aproximada de 40 larvas L⁻¹ en cada uno de los 3 tanques incubadoras con una capacidad de 2000 L. La eclosión de los huevos comenzó a partir de las 24 horas, tomando en cuenta este día como el 0 DDE. El cultivo larvario se realizó en estos mismos tanques que contaban con un sistema de filtración independiente. El agua de mar suministrada proviene de un sistema de circulación semicerrado en donde continuamente se pasa por un filtro de cartucho de 10 µm para eliminar sólidos suspendidos en el agua, un filtro de carbón activado, una lámpara de luz UV para eliminar toda clase de microorganismos presentes en el agua y por último por un biofiltro expandible de cuentas de plástico o “beads” para retirar cualquier sedimento y restos de NH₄ presentes en el agua.

El cultivo larval de totoaba se realizó a una temperatura de 22 ±1 °C y un fotoperíodo de 24 horas luz los primeros 7 días y 12:12 luz:oscuridad para el resto del bioensayo. Se mantuvo una concentración de oxígeno disuelto de 6.5 ±0.05 mg L⁻¹ y una salinidad de 35 ±0.5 ppm (Gisbert *et al.*, 2003). Se suministró agua

de mar desde el fondo del tanque a la superficie con un flujo aproximado de 3 $L\text{min}^{-1}$, con una aireación suficiente baja para evitar que la corriente producida fuera capaz de transportar a las larvas a través de la columna de agua.

El protocolo de alimentación se modificó del descrito para la corvina dorada (*Sciaenops ocellatus*) por Lazo *et al.*, (2000). Brevemente, a partir del tercer DDE las larvas fueron alimentadas dos veces al día (8:00 y 15:00 hrs) con rotíferos (*Brachionus plicatilis*) a una densidad inicial de 3 rotíferos mL^{-1} aumentando gradualmente en los días consecutivos hasta llegar a 10 rotíferos mL^{-1} . Los rotíferos fueron previamente enriquecidos durante 24 horas con una emulsión de Algamac 3050™ (Aquafauna Bio-Marine Inc.) a una ración de 300 mg de Algamac por cada millón de rotíferos (según recomendaciones del productor). Para asegurar mantener una densidad constante de rotíferos en las tinas de cultivo, se realizaban conteos en la mañana y en la tarde para determinar la ración adecuada de rotíferos que debían administrarse.

A partir del 19 DDE las larvas de totoaba comenzaron a alimentarse simultáneamente (coalimentación) con rotíferos y con nauplios de *Artemia* sp. (Salt Creek, UT, USA) enriquecidos con la emulsión de Algamac 3050™, siguiendo un protocolo de enriquecimiento similar al de rotíferos (Zacarias *et al.*, 2006). Las densidades iniciales de *Artemia* comenzaron con 1 nauplio mL^{-1} , aumentando gradualmente hasta llegar a 5 nauplios mL^{-1} . A partir del 22 DDE y hasta el 27 DDE, las larvas se alimentaron únicamente con *Artemia*.

El periodo de coalimentación o “cofeeding” en el cual se lleva a cabo la transición de alimento, ya sea entre rotífero y *Artemia* ó entre alimento vivo y formulado, se realizó con un incremento diario del 25 % del nuevo alimento a la vez que disminuye en esa misma proporción el alimento a cambiar (Tabla I), es decir:

Tabla I.- Protocolo típico de transición de alimento

| Día transición | Alimento A (%) | Alimento B (%) |
|-----------------------|-----------------------|-----------------------|
| 1 | 100 | 0 |
| 2 | 75 | 25 |
| 3 | 50 | 50 |
| 4 | 25 | 75 |
| 5 | 0 | 100 |

El alimento formulado se suministró en una ración diaria de 1 gr, proporcionado de una manera constante durante un periodo de 8 hrs mediante un alimentador automático de platina giratoria (Rainbow, Lifegard Aquatic). Se utilizó una microdieta comercial marca Othohime (Japón). Los tamaños de partícula relacionada con el diámetro de abertura bucal ($B_1= 200-360 \mu\text{m}$; $B_2= 360-620 \mu\text{m}$; $C_1= 200-360 \mu\text{m}$)

V.1.3. Bioensayo del experimento de larvas de totoaba (*T. macdonaldi*).

Para la realización del bioensayo se tomaron 1100 larvas por tratamiento de los tanques de cultivo de 2000 L y se colocaron en un sistema de 18 tanques cilíndricos de fibra de vidrio con una capacidad de 150 L, a una densidad aproximada de 9 larvas L^{-1} . Cada tratamiento se evaluó por tres repeticiones.

El sistema de cultivo de 18 tanques se dividió en 3 subsecciones de 6 tanques cada uno. Cada subsección estaba constituida por el tratamiento correspondiente y su respectivo control por tres repeticiones (i.e., 3 controles y 3 edades del destete). En cada subsistema de 6 tanques, los tratamientos fueron distribuidos al azar. Tres días antes del comienzo de cada prueba se sembraron

las larvas en los tanques correspondientes con el fin de reducir el estrés por el manejo de las larvas.

A los 35 DDE finalizó el experimento, tomándose éste día como día de cosecha general sin importar el tratamiento. Para conocer el número exacto de organismos sobrevivientes por tratamiento, se realizaron conteos del número de organismos en los días de siembra y cosecha. Para lograr esto, se colocaron las larvas con poco agua en recipientes rectangulares de 2.5 cm de profundidad (charolas de disección plásticas) y posteriormente se tomó una fotografía digital (cámara OLYMPUS C-5060), teniendo en cuenta de abarcar todo el recipiente para evitar subestimar los datos.

Posteriormente se contaron las larvas de cada fotografía con la ayuda del programa "Sigma Scanpro 5" en donde mediante un barrido de imagen se obtuvo el número de larvas presentes.

Para determinar el crecimiento de las larvas en cada tanque se tomaron muestras al azar de 10 organismos con sus respectivas repeticiones para lograr obtener el peso seco (gr) y longitud estándar (mm) al inicio y fin de cada experimento.

El experimento se realizó a una temperatura de $23 \pm 1^{\circ}\text{C}$, una concentración de oxígeno disuelto de 6 mg L^{-1} y a una salinidad de 36 ppm. El agua de mar utilizada provenía de un sistema de recirculación semicerrado que se trató continuamente pasándola a través de un biofiltro expandible de partículas de plástico con una tasa de recambio de $1.56 \text{ L} \cdot \text{min}^{-1}$, una lámpara de luz UV para eliminar toda clase de microorganismos presentes en el agua y una bomba de frío/calor ó "chiller" encargado de mantener el sistema a una temperatura constante. El fotoperíodo empleado durante el experimento fue de 12 horas de luz por 12 horas de oscuridad.

Para evaluar el grado de bienestar de las larvas de totoaba en relación a su peso y longitud, se calculó el Factor de Condición mediante la fórmula (Williams, 2000):

$$K = (100,000 * W) / L^3$$

En donde: W = peso de las larvas en gramos;

L = longitud estándar de las larvas en milímetros.

V.2. Efecto de atractantes sobre la tasa de ingestión de microdietas en larvas de jurel cola amarilla (*S. lalandi dorsalis*)

V.2.1. Cultivo larval

Se obtuvieron huevos fértiles de jurel cola amarilla del Pacífico (*S. lalandi dorsalis*) provenientes de desoves de reproductores mantenidos en cautiverio en las instalaciones de Hubbs-Sea World Research Institute (San Diego, C.A.). Los huevos fueron transferidos, en agua de mar dentro de bolsas de plástico a 20 °C suplementadas con oxígeno puro, a las instalaciones del Laboratorio de Peces Marinos del Departamento de Acuicultura del Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada (CICESE; Ensenada, B.C.).

Los huevos viables fueron separados del resto, mediante la flotabilidad positiva que presentan, retirándolos con cuidado de la superficie y posteriormente desinfectados con formalina al 37 % a una concentración de 0.10 mL L⁻¹ durante una hora.

Posteriormente los huevos fueron transportados al Laboratorio de Cultivo de Larvas para ser sembrados a una densidad aproximada de 40 larvas L⁻¹ en cada uno de los 3 tanques de cultivo con una capacidad de 2000 L. La eclosión de los huevos se registró a partir de los 36 h después de la siembra, tomando en cuenta este día como el 0 DDE, manteniendo a las larvas en los mismos tanques en donde eclosionaron. A las 48 horas la mayoría de los huevos habían eclosionado. Para este lote de huevos se cuantificó una tasa de eclosión del 64 %. Posteriormente, se procedió a remover todos los restos de corion de los huevos eclosionados y los huevos no eclosionados.

El cultivo larval del jurel cola amarilla se realizó a una temperatura de 22 ±1°C en los tanques y un fotoperíodo de 24 horas de luz continua los primeros 7 DDE procurando tener una intensidad lumínica equivalente a 5000 lux (Fisher Scientific* Traceable* Dual-Range Light Meter, Pittsburgh, USA) una concentración de oxígeno disuelto de 6.5 ±0.05 mg L⁻¹, una salinidad de 35 ±0.5

ppm (Kolkovski y Sakakura., 2004; J.P. Lazo comunicación personal). Se suministró agua de mar desde el fondo del tanque a la superficie con un flujo de agua de 3 L min^{-1} y una aireación suficiente para evitar la sedimentación de las larvas. A partir de los 8 DDE se aplicó un fotoperíodo de 12:12 L:O.

El agua de mar suministrada provino del sistema de circulación semicerrado del laboratorio de cultivo de larvas, en donde continuamente se pasa por un filtro de cartucho de $10 \mu\text{m}$ para eliminar sólidos suspendidos en el agua, un filtro de carbón activado, una lámpara de luz UV para eliminar bacterias presentes en el agua y por ultimo por un biofiltro expandible de cuentas de plástico o “beads” para retirar partículas ($> 10 \mu\text{m}$) suspendidas en el agua y el NH_4 presente en el agua.

Siguiendo el protocolo descrito (Kolkovski y Sakakura, 2004, J.P. Lazo comunicación personal) a partir de 2 DDE las larvas fueron alimentadas con rotíferos (*Brachionus plicatilis*) a una densidad inicial de 3 rotíferos, aumentando gradualmente en los días consecutivos hasta llegar a 30 rotíferos mL^{-1} . Los rotíferos y nauplios de *Artemia* fueron enriquecidos con Algamac 3050™ de acuerdo a lo descrito en secciones anteriores. Para asegurar mantener una densidad constante de rotíferos en las tinas de cultivo se realizaban conteos en la mañana y en la tarde para determinar la ración adecuada de rotíferos que debían administrarse. Para reducir la tasa de canibalismo y reducir un poco el estrés por parte de las larvas, estas fueron cultivadas en con la adición de Nannochloropsis a una densidad aproximada de 500,000 cel. mL^{-1} (Moran, 2007). Tratamiento conocido como “agua verde”.

A partir de 10 DDE las larvas de jurel comenzaron a coalimentarse simultáneamente con rotíferos y nauplios de *Artemia sp.* (Salt Creek, UT, USA) enriquecidos con la emulsión de Algamac 3050™, siguiendo un protocolo similar al de rotíferos. Las densidades iniciales de *Artemia* fueron de 2 nauplios mL^{-1} , llegando a 10 nauplios mL^{-1} al final del experimento.

V.2.2. Formulación y preparación de las microdietas

Para lograr cuantificar las tasas de ingestión de las microdietas se desarrolló una técnica utilizando microesferas fluorescentes, como marcador inerte. Para esto, se utilizaron microesferas de poliestireno fluorescentes verde-amarillas con un diámetro de 10 μm y una señal de excitación y emisión de 505 y 515 nm, respectivamente (Fluospheres[®], Molecular Probes/ Carlsbad, CA. USA).

Se añadieron 800 000 esferas a cada gramo de alimento formulado. Las microdietas fueron formulados (Tabla II), mezcladas y preparadas en el Laboratorio del Dr. Lou D´Abramo del Departamento de Vida Salvaje y Pesquerías en la Universidad Estatal de Mississippi (Wildlife & Fisheries Department, Mississippi State University).

Tabla II. Composición proximal de los ingredientes de la dieta (% peso seco)

| INGREDIENTE | Porcentaje |
|---------------------------------|------------|
| Hidrolizado proteína de pescado | 20 |
| Caseína | 25 |
| Proteína de Soya | 5 |
| Lecitina de soya | 4 |
| Gluten de trigo | 10 |
| Aceite de arenque y maíz (2:1) | 7 |
| Cantaxantina (10%) | 2.31 |
| Colesterol | 0.12 |
| Ascorbylpalmitato | 0.04 |
| Mezcla de Vitaminas BML-2 | 4 |
| Mezcla Mineral BTm | 3 |
| Betaína | 0.15 |
| KH_2PO_4 | 1.15 |
| Alginato de Sodio | 5.38 |
| Dextrina | 12.85 |

Para caracterizar el efecto de los atractantes sobre la tasa de ingestión de las microdietas, cada atractante se evaluó a una concentración de 10^{-3} M. Esta concentración del atractante en el agua ha sido cuantificada como la necesaria para generar un estímulo y comportamiento alimenticio en larvas de peces (Carr *et al.*, 1996). Para el tratamiento Mixto se utilizaron las proporciones de los atractante recomendadas por Papatryphon y Soares (2002). En las Tablas III y IV, se hace referencia a la cantidad (mg) de cada uno de los atractantes utilizado.

Tabla III. Cantidad de atractante utilizado para lograr una concentración de 10^{-3} Molar en las unidades experimentales de 500 mL.

| Atractante | mg |
|------------|---------|
| Alanina | 44.545 |
| Betaína | 58.575 |
| IMF | 196.085 |
| Serina | 52.545 |

Tabla IV. Cantidad de atractantes utilizados en el tratamiento Mixto para lograr una concentración de 10^{-3} Molar.

| Mezcla de | % | mg |
|-----------|------|----------|
| Alanina | 25 | 11.13625 |
| Betaína | 25 | 14.64375 |
| IMF | 12.5 | 23.5302 |
| Serina | 37.5 | 19.44165 |

V.2.3. Bioensayo del experimento de larvas de jurel cola amarilla (*S. lalandi*).

Se evaluó el efecto de los atractantes sobre las tasas de ingestión de las microdietas en diferentes etapas de desarrollo de las larvas de jurel (5, 10, 15 y 20 DDE). Para esto, en cada día a evaluar, se tomaron al azar 100 larvas provenientes de los tanques de 2000 L donde se realizaba el cultivo larval masivo. Para asegurar que las larvas no tuvieran alimento en el tracto digestivo al momento del bioensayo, estas fueron colectadas una noche antes y concentradas

en un recipiente plástico de 10 L, con agua del tanque de compensación del sistema de recirculación de los cultivos larvarios. Se aplicó aireación suministrada mediante una piedra aireadora con un flujo suficiente para evitar que las larvas se sedimentaran en el recipiente y mantener la concentración de oxígeno adecuada.

El día del bioensayo, 10 larvas fueron transferidas a recipientes de plástico 500 mL de agua de mar pasada por el sistema de filtración (mencionado anteriormente). Posteriormente se añadió el attractante previamente disuelto en 50 mL de agua destilada y a continuación se suministró 30 mg de la dieta marcada, Para asegurar que siempre hubiese dieta disponible en la columna de agua, se suministró por segunda vez, 30 mg de alimento a los 60 min. Una vez transcurridas las 2 h del momento que se añadió el alimento inicial, se procedió a tomar las muestras de larvas para evaluar la cantidad de alimento ingerido por medio del análisis de la fluorescencia en el tracto digestivo.

Se debe además asegurar que los niveles de fluorescencia estén dentro del rango establecidos en la curva de calibración para poder determinar la tasa de ingestión de una manera adecuada. Por lo tanto, a los 5 y 10 DDE se utilizaron 10 larvas, mientras que para 15 y 20 DDE se utilizaron 6 y 4 larvas respectivamente.

Cada tratamiento se examinó por tres repeticiones. Para determinar la presencia de un posible efecto sinérgico entre los attractantes presentes en el tratamiento Mixto, la serina e IMF se analizaron como attractantes independientes los días 15 y 20 DDE.

En cada día en el que se realizó un bioensayo, se registró la longitud estándar de (LE) de 30 organismos en un microscopio estereoscópico equipado con una reglilla micrométrica (Wild-Heerburgg, Suiza). Posteriormente se determinó el peso seco, primero enjuagándolas en agua destilada para quitarles cualquier rastro de sal y posteriormente secarlas durante 24 hrs a 60 °C (Oven series 9000, Thermolyne). Finalmente se registró el peso en una balanza analítica

(Precisa: 92SM-202A. Precisa Instruments Ltd./ Dietikon, Suiza) precisión ± 0.01 mg).

V.2.4. Cuantificación de los niveles de fluorescencia

Para favorecer la desintegración de los tejidos, las larvas colectadas en cada bioensayo, fueron colocadas en tubos de ensayo con 1.5 mL de H_2SO_4 (98%) por aproximadamente una hora, mezclando periódicamente con un vortex (vx 100, LABNET/ NJ, USA)

Se homogenizó la muestra vertiéndola en un tubo agitador de 2 mL previamente preparado con aproximadamente 40 esferas de vidrio de 0.5 mm de diámetro procurando que se transfieran los restos de las larvas así como la mayor cantidad posible de H_2SO_4 . Se agitó la muestra durante 50 segundos a una velocidad de 4200 rpm (Mini-BeadbeaterTM, Biospec Products/ Bartlesville, USA).

Se decantó la muestra en el tubo de ensayo utilizado anteriormente, cuidando de no verter las esferas de vidrio ya que dañan los filtros cuando la muestra sea filtrada. Posteriormente, se colocó la muestra en un baño con hielo durante un minuto para reducir lo más posible la temperatura ya que la muestra debe estar lo más fría posible (al diluirla en el ácido, se genera una reacción exotérmica, lo que puede llegar a dañar las esferas y por consiguiente el nivel de fluorescencia).

Para separar la muestra de las esferas de vidrio, se añadió con una pipeta 1 mL de agua destilada “fría” al tubo agitador (para disolver la mayor cantidad de muestra) y posteriormente se recuperó el mililitro con la misma pipeta teniendo cuidado de no succionar las esferas de vidrio que se quedan en el fondo del tubo, y se añadió dicho mililitro en un tubo de ensayo limpio. Este proceso de lavado se repitió 3 veces para no dejar restos de muestra en el tubo.

Para poder recuperar las fluoroesferas, se filtró la muestra en un sistema “Whatman” con filtros de fibra de vidrio de 25mm \varnothing con una capacidad de retención de 1.2 μm (GF/C). Se añadieron 200 mL de agua destilada “fría” antes

colocar la muestra para terminar de diluir el ácido y evitar que se eleve la temperatura.

Una vez que se filtró la muestra, se utilizó 100 mL de alcohol etílico ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$) puro (98%) para sustituir el agua que se quedó en el filtro (el agua se debe sustituir ya que posteriormente se utiliza Xileno el cual no es soluble en agua).

Se colocó el filtro en un tubo agitador de 2 mL con tapa de rosca ya preparado con esferas de vidrio (40 aprox.). Para liberar la fluorescencia presente en las microesferas, se utilizó el protocolo descrito por Molecular ProbesTM (Carlsbad, CA. USA) Inicialmente se añadió 1200 μl de Xileno. Este disuelve la cubierta de poliestireno de las esferas, liberando el pigmento fluorescente. Para asegurar el efecto del Xileno sobre todas las esferas, se agitó durante 150 segundos a 4600 rpm y se dejó reposar por una hora en la obscuridad. Posteriormente se centrifugó a 13500 rpm durante 5 min a una temperatura de 20°C (Eppendorf Centrifuge 5417R/ Hamburg Germany).

Se tomó con ayuda de una pipeta un mililitro del sobrenadante (cuidando de no succionar el filtro) y se colocó en celdas de borosilicato con capacidad de 5 mL.

Se realizó la lectura de la muestra en el fluorímetro. Se utilizó un filtro de excitación de 460 nm y un filtro de emisión de 520 nm (Turner Quantech Digital Filter Fluorometer, FM109535 /Illinois, USA).

Una vez que se obtuvo el nivel de fluorescencia, se ajustó ese valor a la equivalencia de fluorescencia correspondiente a un cierto número de fluoroesferas, por lo que previamente se realizó una curva de calibración para ajustar los valores.

Una vez que se obtuvo el número real de fluoroesferas presentes en la muestra, se sacó la proporción de la cantidad de alimento ingerido por la larva en donde:

$$800,000 \text{ fluoroesferas} \rightarrow 1 \text{ gr alimento marcado}$$

V.2.4.1. Curva de Calibración

Para lograr obtener una curva de calibración a la cual se ajustarán los niveles de fluorescencia obtenidos en los tratamientos, se procesó la muestra con los pasos antes mencionados, la única diferencia fue que se conocía el número de fluoroesferas que se añadieron a un cierto número de larvas. En este caso se utilizaron 10 larvas de 8 DDE tomadas de una corrida previa de jurel con una concentración conocida de 1000 fluoroesferas.

Una vez que se obtuvo el producto final del proceso de extracción, se hicieron una serie de diluciones en donde se calculó la cantidad de microlitros necesarios para tener el equivalente a 100, 150, 200 y 250 fluoroesferas, aforándose con Xileno a un volumen de 1 mL. Se utilizó Xileno como blanco.

De la regresión lineal de los datos se obtuvo la ecuación (ver Anexo 1):

$$y = 0.66x + 72 \quad (r^2 = 0.97).$$

V.2.4.2. Determinación de un estándar de fluorescencia

Debido a que los niveles de fluorescencia varían en base a la cantidad y tipo de pigmento fluorescente, entre otros factores (i.e. luz, temperatura, etc.), para lograr tener una referencia del nivel de fluorescencia de las fluoroesferas, se utilizó el estándar SRM 1932 (Standard Reference Material 1932, Molecular Probes) a

base de fluoresceína. Este compuesto es el recomendado por el Instituto Nacional de Estándares y Tecnología, USA (NIST, por sus siglas en inglés).

El estándar consta de una solución de fluoresceína 50 µM disuelta en buffer de Borato 100 mM, con un pH de 9.5. Bajo éstas condiciones la fluoresceína presenta un rendimiento cuántico extremadamente alto de 0.93 (Schwartz *et al.*, 2002).

De la regresión lineal de la fluorescencia contra el número de fluoresferas, se obtuvo la siguiente ecuación (ver Anexo 2 y 3):

$$y = 0.9872x + 0.0014 \quad (r^2 = 0.99)$$

En base a lo anterior, se pudo determinar qué:

1 fluoresfera → 0.9986 µM de fluoresceína

V.3. Análisis estadístico:

Para determinar la existencia de diferencias significativas entre las diferentes edades de destete para la totoaba en relación al crecimiento, longitud y porcentaje de supervivencia se realizó un análisis de varianza de una vía (ANOVA), con un nivel de significancia $p < 0.05$. En el caso de existir diferencias estadísticamente significativas, se realizó una comparación de medias utilizando la prueba de Tukey (Zar, 1984).

En el caso del experimento de jurel, para determinar la existencia de diferencias significativas en las tasas de ingestión con los diversos atractantes, se realizó una prueba ANOVA de una vía, con un nivel de significancia $p < 0.05$. En el caso de existir diferencias estadísticamente significativas, se empleó la prueba de comparación de medias Tukey (Zar, 1984).

Para todos los casos los análisis estadísticos se realizaron utilizando el software estadístico STATISTICA 8.0™ (StatSoft, Inc. USA).

VI. RESULTADOS

VI.1. Efecto de la edad de las larvas de totoaba (*T. macdonaldi*) en el éxito en el destete

A los 17 DDE, las larvas de totoaba de los tanques de cultivo masivo alcanzaron un peso seco de 1.59 (± 0.80) mg y una longitud estándar de 6.47 (± 0.64) mm. A los 22 DDE, tenían un peso seco inicial de 1.57 (± 0.11) mg y una longitud estándar inicial de 6.65 (± 1.00) mm; mientras que a los 27 DDE tenían un peso seco inicial 1.82 (± 0.32) mg y una longitud estándar inicial de 11.06 (± 1.52) mm (Tabla V).

Al finalizar el experimento (35 DDE), las larvas de los tratamientos que fueron destetados presentaron un crecimiento en peso y talla significativamente mayor que sus respectivos controles (a excepción del destete 22 DDE). Los tratamientos control, alcanzaron un crecimiento en peso seco casi el doble que sus respectivos controles. Sin embargo, la supervivencia al finalizar el experimento fue significativamente menor para las larvas sometidas al destete con respecto a sus controles (a excepción del destete 22 DDE). Los valores de supervivencia para estos últimos tratamientos fueron casi la mitad que su respectivo control (Tabla V). No se presentaron diferencias significativas en el factor de condición estimado en los tratamientos expuestos al destete 17 DDE y 22 DDE. Sin embargo, en el 27 DDE, el control presentó valores significativamente menores (Tabla V).

Tabla V.-Supervivencia (35DDE), Peso Seco y Longitud Estándar (LE) iniciales y finales correspondientes a las diferentes edades de destete. DE=Desviación estándar (n=3).

| | TIEMPO DE DESTETE | | | | | |
|--------------------------------|-------------------|---------------|--------|-------|---------------|---------------|
| | 17 DDE | | 22 DDE | | 27 DDE | |
| | D17 | C17 | D22 | C22 | D27 | C27 |
| Peso Seco Inicial (mg) | 1.55 | | 1.58 | | 1.82 | |
| DE | 0.8 | | 0.11 | | 0.32 | |
| Longitud Estándar Inicial (mm) | 6.47 | | 6.66 | | 11.07 | |
| DE | 0.64 | | 1.00 | | 1.52 | |
| Peso Seco Final (mg) | *40.73 | 18.22 | 34.79 | 16.10 | *40.45 | 18.52 |
| DE | 3.11 | 2.30 | 11.50 | 5.92 | 2.98 | 0.93 |
| Longitud Estándar Final (mm) | *27.74 | 22.92 | 26.29 | 21.83 | *28.21 | 22.75 |
| DE | 3.21 | 1.84 | 3.73 | 2.31 | 4.15 | 2.31 |
| Supervivencia (%) | *16.27 | *30.96 | 15.63 | 35.36 | *13.11 | *30.55 |
| DE | 3.84 | 7.26 | 11.13 | 25.86 | 2.46 | 9.98 |
| Factor de Condición | 0.191 | 0.151 | 0.185 | 0.150 | *0.180 | 0.157 |
| DE | 0.02 | 0.01 | 0.02 | 0.02 | 0.01 | 0.01 |

***= diferencia estadísticamente significativa**

VI.1.1. Destete temprano (17 DDE)

La longitud final resultó ser significativamente mayor para el tratamiento D17 con respecto a su control (C17), alcanzando valores de 27.74 ± 3.21 mm y 22.92 ± 1.84 mm, respectivamente (Figura 5). El peso seco final fue significativamente mayor para el tratamiento D17 con respecto a su control (C17), con valores de 40.73 ± 3.11 mg y 18.22 ± 2.30 mg respectivamente (Figura 6). La supervivencia resultó ser significativamente menor para el tratamiento D17 en relación a su control (C17), presentando valores de 16.27 ± 3.84 % y 30.96 ± 7.26 % respectivamente (Figura 7). No se encontraron diferencias significativas en el factor de condición entre el tratamiento D17 con respecto a su control (C17), con valores de 0.191 ± 0.02 y 0.151 ± 0.01 correspondientemente (Figura 8).

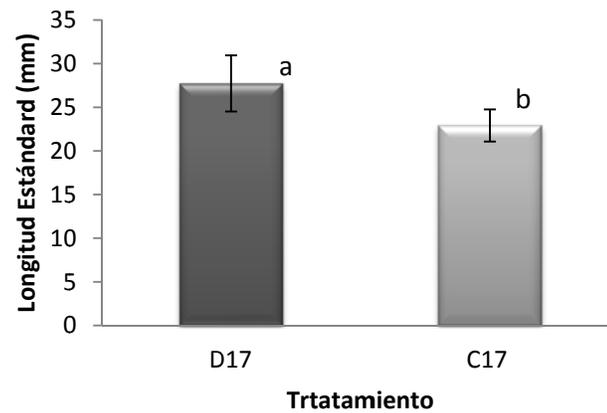


Figura 5. Longitud Estándar (mm) de las larvas de totoaba destetadas a los 17 DDE (D17) y su respectivo control (C17). Las barras de error representan la desviación estándar de la media (n=3). Las columnas con diferentes letras indican diferencia significativas a $p < 0.05$.

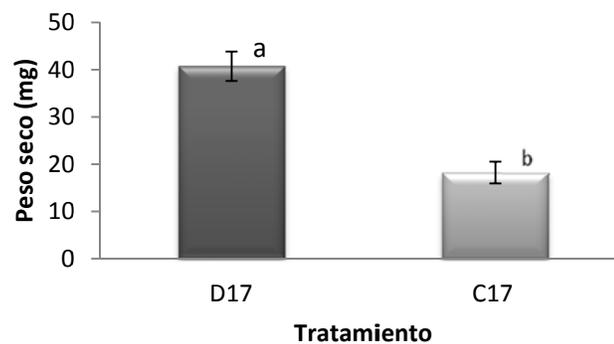


Figura 6. Peso Seco (mg) de las larvas destetadas 17 DDE (D17) y su respectivo control (C17). Las barras de error representan la desviación estándar de la media (n=3). Las columnas con diferentes letras indican diferencia significativas a $p < 0.05$.

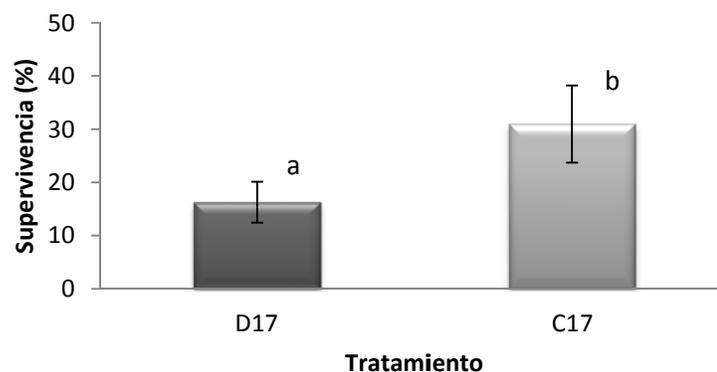


Figura 7. Supervivencia (%) de las larvas de totoaba destetadas a los 17 DDE (D17) y su respectivo control (C17). Las barras de error representan la desviación estándar de la media (n=3). Las columnas con diferentes letras indican diferencia significativas a $p < 0.05$.

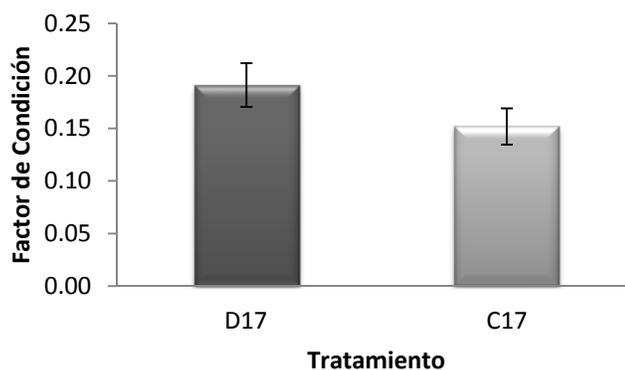


Figura 8. Factor de condición de las larvas de totoaba destetadas a los 17 DDE (D17) y su respectivo control (C17). Las barras de error representan la desviación estándar de la media (n=3). No se presenta diferencia significativas ($p>0.05$).

VI.1.2. Destete intermedio (22DDE)

La longitud final no fue significativamente diferente para el tratamiento D22 con respecto a su control (C22), alcanzando valores de 26.30 ± 3.73 mm y 21.83 ± 2.31 mm, respectivamente (Figura 9). El peso seco final no fue significativamente diferente para el tratamiento D22 en relación a su control (C22), con valores de 34.79 ± 11.50 mg y 16.10 ± 5.92 mg respectivamente (Figura 10). No se encontraron diferencias significativas en supervivencia entre el tratamiento D22 y su respectivo control (C22), presentando valores de 15.63 ± 11.13 % y 35.36 ± 25.86 % respectivamente (Figura 11). No se encontraron diferencias significativas en el factor de condición, entre el tratamiento D22 con respecto a su control (C22), con valores de 0.185 ± 0.02 y 0.150 ± 0.02 respectivamente (Figura 12).

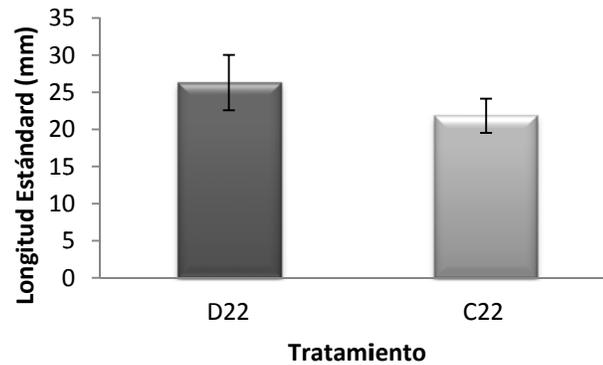


Figura 9. Longitud Estándar (mm) de las larvas de totoaba destetadas a los 22 DDE (D22) y su respectivo control (C22). Las barras de error representan la desviación estándar de la media (n=3). Las columnas con diferentes letras indican diferencia significativas a $p < 0.05$.

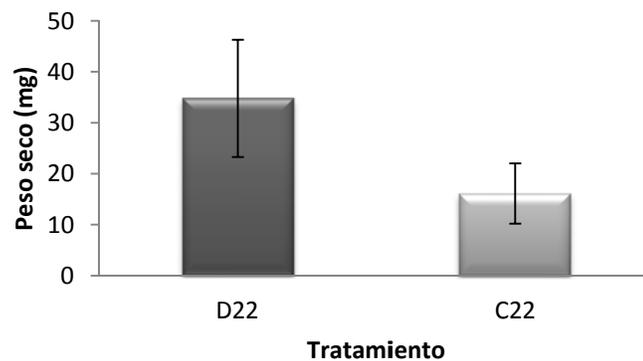


Figura 10. Peso Seco (mg) de las larvas de totoaba destetadas a los 22 DDE (D22) y su respectivo control (C22). Las barras de error representan la desviación estándar de la media (n=3). Las columnas con diferentes letras indican diferencia significativas a $p < 0.05$.

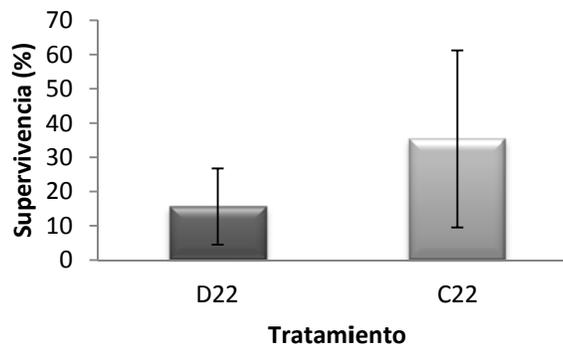


Figura 11. Supervivencia (%) de las larvas de totoaba destetadas a los 22 DDE (D22) y su respectivo control (C22). Las barras de error representan la desviación estándar de la media (n=3). Las columnas con diferentes letras indican diferencia significativas a $p < 0.05$.

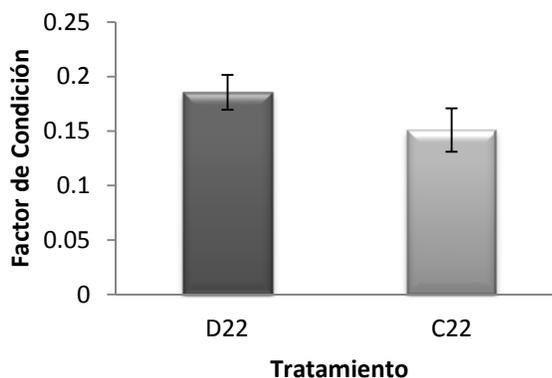


Figura 12. Factor de condición de las larvas de totoaba destetadas a los 22 DDE (D22) y su respectivo control (C22). Las barras de error representan la desviación estándar de la media (n=3). No se presenta diferencia significativas ($p>0.05$).

VI.1.3. Destete tardío (27DDE)

La longitud final resultó ser significativamente mayor para el tratamiento D27 con respecto a su control (C27), alcanzando valores de 28.21 ± 4.15 mm y 22.75 ± 2.31 mm, respectivamente (Figura 13). El peso seco final fue significativamente mayor para el tratamiento D27 con respecto a su control (C27), con valores de 40.45 ± 2.98 mg y 18.52 ± 0.93 mg respectivamente (Figura 14). La supervivencia resultó ser significativamente menor ($p=0.042$) para el tratamiento D27 en relación a su control (C27), presentando valores de 11 ± 2.46 % y 30.54 ± 9.98 respectivamente (Figura 15). No se encontraron diferencias significativas en el factor de condición entre el tratamiento D27 con respecto a su control (C27), con valores de 0.180 ± 0.01 y 0.157 ± 0.01 correspondientemente (Figura 16).

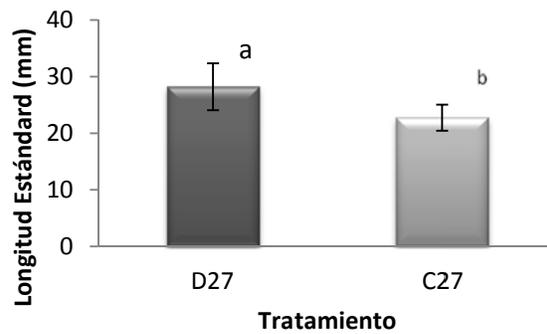


Figura 13. Longitud Estándar (mm) de las larvas de totoaba destetadas a los 27 DDE (D27) y su respectivo control (C27). Las barras de error representan la desviación estándar de la media (n=3). Las columnas con diferentes letras indican diferencia significativas a $p < 0.05$.

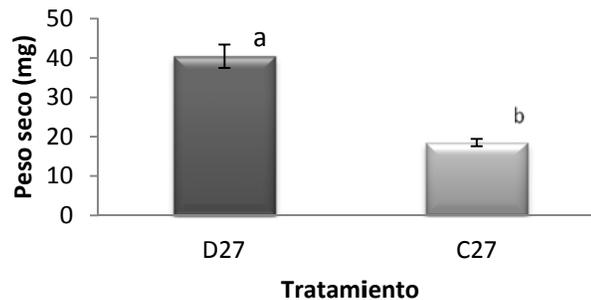


Figura 14. Peso Seco (mg) de las larvas de totoaba destetadas a los 27 DDE (D27) y su respectivo control (C27). Las barras de error representan la desviación estándar de la media (n=3). Las columnas con diferentes letras indican diferencia significativas a $p < 0.05$.

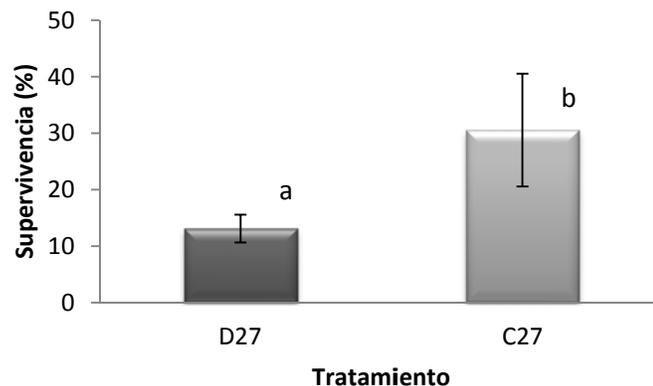


Figura 15. Supervivencia (%) de las larvas de totoaba destetadas a los 27 DDE (D27) y su respectivo control (C27). Las barras de error representan la desviación estándar de la media (n=3). Las columnas con diferentes letras indican diferencia significativas a $p < 0.05$.

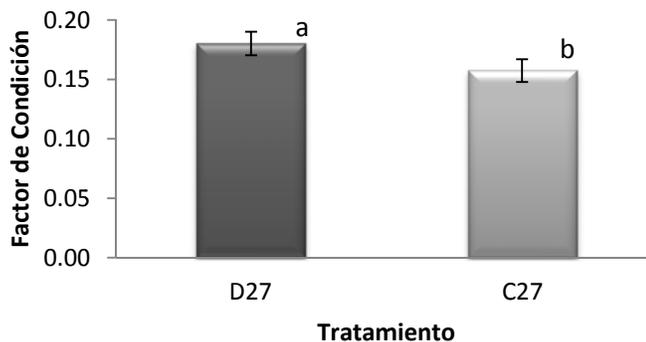


Figura 16 Factor de condición de las larvas de totoaba destetadas a los 27 DDE (D27) y su respectivo control (C27). Las barras de error representan la desviación estándar de la media (n=3). No se presenta diferencia significativas ($p>0.05$).

VI.1.4. Comparación de los destetes en las diferentes edades

En las secciones anteriores, se comparó por separado el éxito del destete en cada uno de las diferentes edades (17, 22 y 27 DDE) en relación a su respectivo control. A continuación se comparan los resultados obtenidos entre las tres diferentes edades de destete para determinar si existe alguna diferencia significativa entre ellas.

Al finalizar el experimento (35 DDE), la longitud final no fue significativamente diferente para los destetes correspondientes a los 17, 22 y 27 DDE, alcanzando valores de $27.737 \pm 3.21\text{mm}$, $26.292 \pm 3.73\text{mm}$ y $28.208 \pm 4.15\text{mm}$, respectivamente (Figura 17). El peso seco final no presentó una diferencia significativa entre los destetes correspondientes a los 17, 22 y 27 DDE, alcanzando valores de $40.733 \pm 3.11\text{ mg}$, $43.791 \pm 11.50\text{ mg}$ y $40.450 \pm 2.98\text{ mg}$, respectivamente (Figura 18). La supervivencia resultó no tener diferencia significativa entre los destetes correspondientes a los 17, 22 y 27 DDE, alcanzando valores de $16.274 \pm 3.84\%$, $15.629 \pm 11.13\%$ y $13.108 \pm 2.46\%$, respectivamente (Figura 19). Para el factor de condición, no se encontraron diferencias significativas ($p>0.05$) entre los destetes correspondientes a los 17, 22

y 27 DDE, alcanzando valores de 0.191 ± 0.02 , 0.185 ± 0.02 y 0.180 ± 0.01 , correspondientemente (Figura 20).

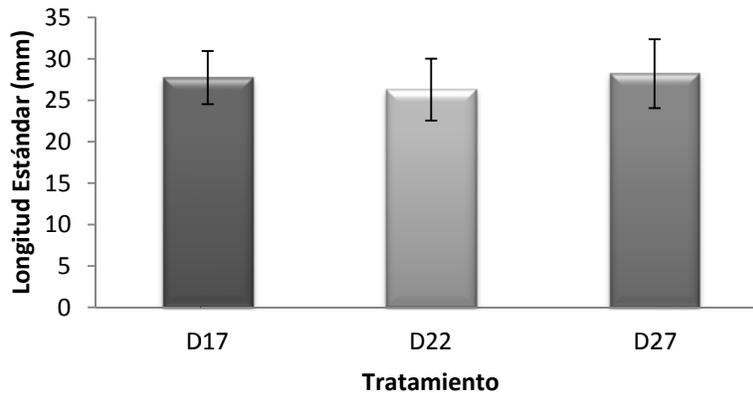


Figura 17. Longitudes estándar (mm) de las larvas de totoaba obtenidas al final del experimento (35 DDE), para los destetes los días 17, 22 y 27 DDE. Las barras de error representan la desviación estándar de la media (n=3). No se presenta diferencia significativa entre tratamientos.

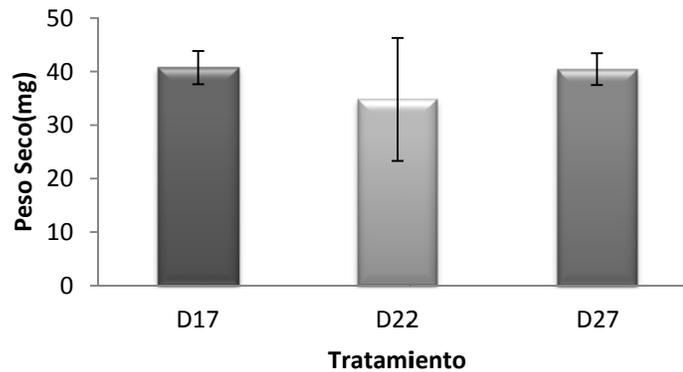


Figura 18. Pesos secos (mg) de las larvas de totoaba obtenidas al final del experimento (35 DDE), para los destetes los días 17, 22 y 27 DDE. Las barras de error representan la desviación estándar de la media (n=3). No se presenta diferencia significativa entre tratamientos.

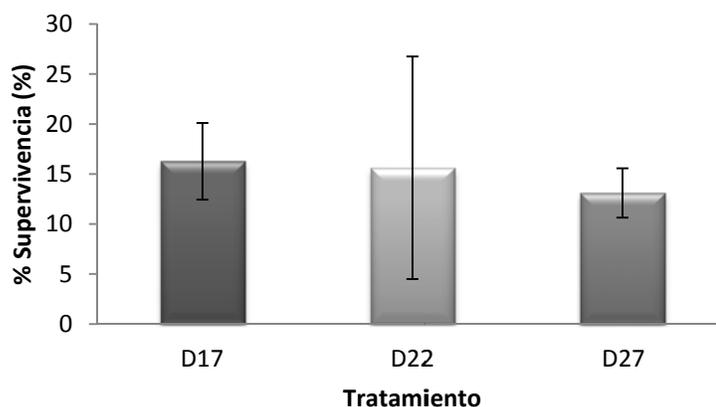


Figura 19. Supervivencias (%) de las larvas de totoaba obtenidas al final del experimento (35 DDE), para los destetes los días 17, 22 y 27 DDE. Las barras de error representan la desviación estándar de la media (n=3). No se presenta diferencia significativa entre tratamientos.

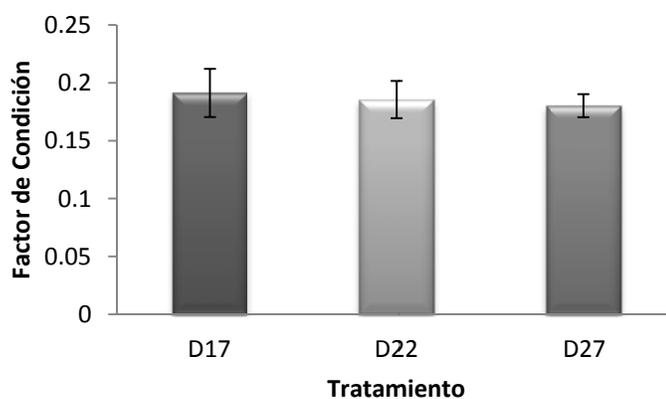


Figura 20. Factor de condición de las larvas de totoaba obtenidas al final del experimento (35 DDE), para los destetes los días 17, 22 y 27 DDE. Las barras de error representan la desviación estándar de la media (n=3). No se presenta diferencia significativa entre tratamientos.

VI.2. Efecto de atractantes sobre la tasa de ingestión de microdietas en larvas de jurel cola amarilla (*S. lalandi dorsalis*) Quitar el subrayado

VI.2.1. Cuantificación de las tasas de ingestión por medio de la fluorescencia de las microdietas.

Con base en los bioensayos preliminares se logró corroborar que la metodología desarrollada en el presente estudio para determinar las tasas de ingestión mediante el uso de microesferas fluorescentes funcionó de una manera exitosa. El uso de esta nueva metodología se puede llegar a utilizar en futuros estudios de nutrición larvaria (ver sección de apéndices).

Las larvas de jurel con una longitud de 4.83 mm (5DDE) y 6.77 mm (20DDE), tuvieron una tasa de ingestión de 19.16 ± 0.44 y 82.54 ± 8.45 μg de alimento consumido por hora, respectivamente. Chu y Ozkizilcik (1999) encontraron que las larvas de lubina rayada (*M. saxatilis*) con una longitud aproximada de 5.5 mm (7DDE) presentan una tasa de ingestión aproximada de $33 \mu\text{g h}^{-1}$ de alimento. De igual manera Muscato *et al.* (2009), reportan una tasa de ingestión de $90 \mu\text{g h}^{-1}$ de alimento en larvas del bacalao del atlántico (*Gadus morhua*) con una longitud de 8.75 mm (26DDE). Los resultados anteriores nos indican que las tasas de ingestión mostradas por las larvas de jurel se encuentran dentro del rango esperado para larvas de tallas similares.

VI.2.2. Tasa de ingestión obtenida a los 5 DDE

No se registraron diferencias significativas en las tasas de ingestión entre los diferentes tratamientos a los 5 DDE. Sin embargo, se observó que las larvas del tratamiento Control (19.16 ± 0.44 μg de dieta por hora) tuvieron tasas de ingestión más altas, seguido por las larvas del tratamiento Alanina (18.90 ± 1.19 μg de dieta por hora). Por su parte, las larvas sometidas al tratamiento Mixto (18.30 ± 0.59 μg de dieta por hora) y el tratamiento Betaína (18.02 ± 0.15 μg de dieta por hora) resultaron con las tasas de ingestión con los valores más bajos (Figura 21).

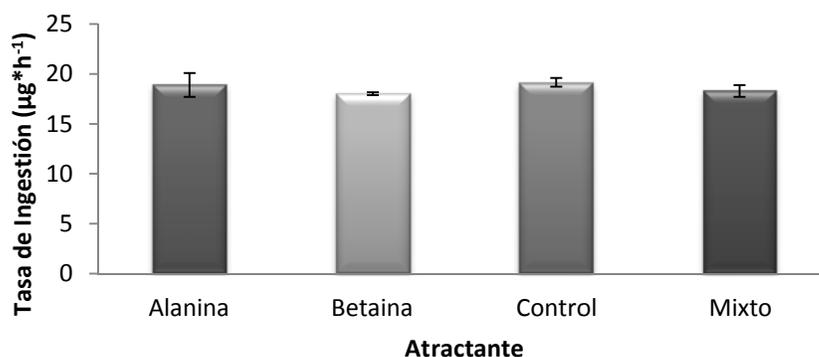


Figura 21. Tasa de ingestión de larvas de jurel aleta amarilla en base a los diferentes tratamientos en el primer muestreo (5DDE). Las barras de error representan la desviación estándar de la media (n=3). No se presenta diferencia significativa entre tratamientos

VI.2.3. Tasa de ingestión obtenida a los 10DDE

No se registraron diferencias significativas en las tasas de ingestión entre los diferentes tratamientos a los 10 DDE. Sin embargo, se observó que las larvas del tratamiento Alanina (22.45 ± 0.474 µg de dieta por hora) tuvieron tasas de ingestión más altas, seguido por las larvas del tratamiento Betaína (22.05 ± 0.068 µg de dieta por hora). Por su parte, las larvas sometidas al tratamiento Mixto (21.60 ± 1.52 µg de dieta por hora) y el tratamiento Control (21.24 ± 0.77 µg de dieta por hora) resultaron con las tasas de ingestión con los valores más bajos (Figura 22).

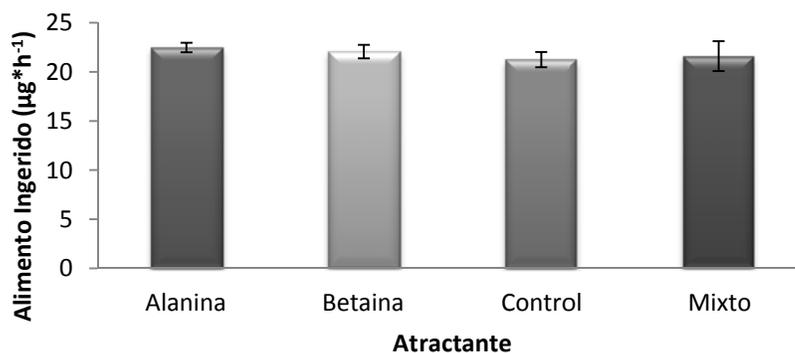


Figura 22. Tasa de ingestión de larvas de jurel aleta amarilla en base a los diferentes tratamientos en el segundo muestreo (10DDE). Las barras de error representan la desviación estándar de la media (n=3). No se presenta diferencia significativa entre tratamientos

VI.2.4. Tasa de ingestión obtenida a los 15DDE

Las larvas que recibieron el tratamiento mixto (38.34 ± 0.37 μg de dieta por hora) presentaron una tasa de ingestión significativamente mayores a los demás tratamientos a los 15 DDE. La tasa de ingestión de los tratamientos Alanina (37.12 ± 0.47 μg de dieta por hora), Betaína (36.23 ± 0.38 μg de dieta por hora), Control (36.87 ± 0.43 μg de dieta por hora) y Serina (36.96 ± 0.43 μg de dieta por hora) fueron similares sin encontrarse diferencias significativas entre ellas. Por su parte las tasas de ingestión del tratamiento IMF resultaron en los valores más bajos (34.95 ± 0.34 μg de dieta por hora) y fueron significativamente menores que el resto de los tratamientos (Figura 23).

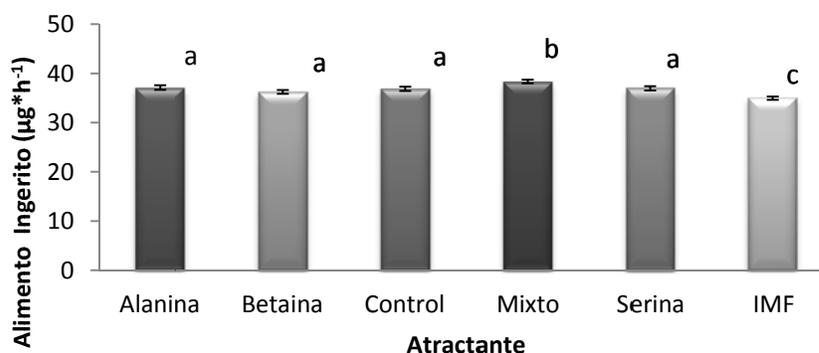


Figura 23. Tasa de ingestión de larvas de jurel aleta amarilla en base a los diferentes tratamientos en el tercer muestreo (15DDE). Las barras de error representan la desviación estándar de la media (n=3). No se presenta diferencia significativa entre tratamientos

VI.2.5. Tasa de ingestión obtenida a los 20DDE

No se registraron diferencias significativas en las tasas de ingestión entre los diferentes tratamientos a los 20 DDE. Sin embargo, se observó que las larvas del tratamiento Betaína (82.54 ± 8.45 μg de dieta por hora) tuvieron tasas de ingestión más altas, seguido por las larvas del tratamiento Alanina (72.74 ± 2.94 μg de dieta por hora). Por su parte, las larvas sometidas al tratamiento Mixto (77.50 ± 2.27 μg de dieta por hora), Control (75.85 ± 1.56 μg de dieta por hora), Serina

(74.10 \pm 1.65 μ g de dieta por hora) e IMF (74.97 \pm 1.58 μ g de dieta por hora) resultaron con las tasas de ingestión con los valores más bajos (Figura 24).

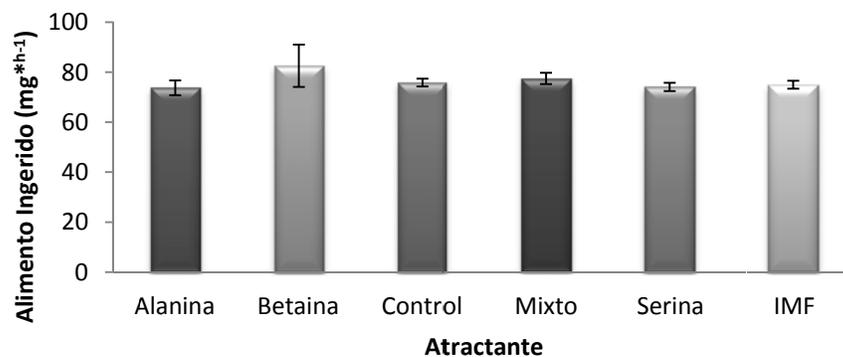


Figura 24. Tasa de ingestión de larvas de jurel aleta amarilla en base a los diferentes tratamientos en el cuarto muestreo (20DDE). Las barras de error representan la desviación estándar de la media (n=3). No se presenta diferencia significativa entre tratamientos.

VII. DISCUSIONES

VII.1. Efecto de la edad en el éxito del destete en larvas de totoaba (*T. macdonaldi*).

Considerando el crecimiento, supervivencia y factor de condición como variables de respuesta en el presente trabajo se logró obtener un destete exitoso a la edad más temprana evaluada (17 DDE). En el destete temprano (17DDE) y tardío (27DDE) se registraron diferencias significativamente mayores tanto en longitud como en peso respecto a su tratamiento control, mientras que para el destete intermedio (22DDE), se obtuvieron resultados similares en el tratamiento control y el del destete. Sin embargo, aunque no se encontraron diferencias significativas, la tendencia fue similar a las otras dos edades de destete evaluadas. Es probable que la variabilidad en los datos obtenidos haya enmascarado las diferencias encontradas.

En el caso del destete temprano (17DDE), se realizó una transición directa, pero progresiva, de rotíferos al alimento formulado. Coincidiendo con los resultados de Holt (1993) y de Herrera *et al.* (2010), en donde de igual manera se lograron destetes exitosos en larvas de corvina (*Sciaenops ocellatus*) y de acedia (*Dicologlossa cuneata*) en 8 y 30 DDE, respectivamente sin el uso de *Artemia*.

En el caso de los destetes intermedio y tardío, realizados los 22 y 27 DDE, la transición de alimento se realizó de *Artemia* al alimento formulado. Kolkovski *et al.* (1997), al igual que Koven *et al.* (2001) mencionan que para el caso de las larvas de la dorada (*S. aurata*), la presencia de *Artemia* en el proceso de co-alimentación aumenta el desempeño de la microdieta hasta en casi 100%, reflejándose principalmente en el crecimiento de las larvas. Sin embargo, en el presente estudio no se observó ningún efecto positivo por el uso de *Artemia* en el proceso del destete de larvas de totoaba.

La importancia de coalimentar a las larvas con alimento vivo y formulado, es una de las estrategias de destete que más éxito ha tenido, ya que permite que las larvas se vayan adaptando de una manera gradual a las características físico-bioquímicas de la nueva dieta (Holt, 1993; Le Ruyet *et al.*, 1993; Cahu y Zambonino Infante, 1994; Kolkovski *et al.*, 1997; Chu y Ozkizilcik, 1999; Zambonino Infante y Cahu, 2001; García-Ortega *et al.*, 2003; Hamza *et al.*, 2007; Herrera *et al.*, 2010). Ribeiro *et al.* (2005), mencionan que esta estrategia no se recomienda en periodos largos, ya que las larvas del lenguado senegalés (*Solea senegalensis*) se acostumbran a la presencia de alimento vivo (que por lo general prefieren) reduciendo las tasas de ingestión del alimento formulado hasta en un 50%.

La principal limitante en el proceso de destete, está relacionada entre otros factores, a la deficiencia de ciertos procesos digestivos en las etapas tempranas de desarrollo larval (Kolkovski *et al.*, 1997; Koven *et al.*, 2001; Zambonino Infante y Cahu, 2001; Cahu *et al.*, 2004; Bjelland y Skiftesvik, 2006; Engrola *et al.*, 2007; Hamza y Mhetli, 2007; Herrera *et al.*, 2010). Por lo tanto, el verdadero éxito en la realización del destete radica en suministrar microdietas adecuadas a las características digestivas y metabólicas (procesos de absorción y transporte) de las larvas (Person-Le Ruyet, 1993, Lazo *et al.* 2007). Cabe mencionar que en varias especies de peces marinos y en particular en el cultivo de peces planos, ninguna especie ha sido capaz de destetarse previo al proceso de metamorfosis, debido en parte al grado de maduración del tracto digestivo antes de la metamorfosis y al proceso tan “estresante” desde el punto de vista fisiológico y biológico que es la misma metamorfosis (Lee y Litvak, 1996; Engrola, 2007; Muguet *et al.*, 2010).

El buen desempeño encontrado en el destete temprano (17DDE, LT 6.47 mm), nos sugiere que las larvas presentaron un tracto digestivo lo suficientemente desarrollado capaz de digerir la microdieta de una manera apropiada. Valverde (2002), menciona que en el caso de las larvas de corvina blanca (*Atractoscion*

nobilis) a los 16DDE (LT 4.22 mm) ya presentaba secreción de ácido gástrico y pepsina, las cuales son características de un estómago funcional.

En la actualidad se ha logrado destetar larvas de peces marinos en etapas cada vez más tempranas. Lazo *et al.* (2000), lograron un destete exitoso desde la primera alimentación en larvas de corvina (*S. ocellatus*), sin la utilización de ningún organismo zooplantónico. Similarmente, especies como, la lubina europea (*Dicentrarchus labrax*) y la lucioperca (*Sander luciperca*), han sido alimentadas con una microdieta desde el momento de la apertura bucal (Cahu y Zambonino Infante, 1994; Cahu *et al.*, 2004; Ostaszewska *et al.*, 2005). Lo anterior sugiere que en base al nivel de desarrollo del tracto digestivo de las larvas de totoaba a los 6.47 mm (17DDE) (Valverde *et al.* 2002; Galaviz *et al.*, 2010), estas podrían ser destetadas exitosamente aun con menor grado de desarrollo. Es importante realizar más estudios caracterizando la ontogenia del sistema digestivo y la capacidad digestiva en esta especie para desarrollar microdietas y protocolos de destete a edades más tempranas.

En relación a la supervivencia, se presentó una tendencia similar entre las tres edades de destete, con valores cercanos a un 50% menor que su respectivo control. Para el destete temprano ($16.27 \pm 3.84\%$) y el tardío ($13.10 \pm 2.46\%$) se presentaron valores de supervivencia significativamente menores que su respectivo control. Mientras que el destete intermedio presentó una supervivencia de $15.62 \pm 11.23\%$, que no fue significativamente diferente de su control.

Se podría considerar que en el destete temprano (17 DDE) se obtuvieron supervivencias aceptables ($16.27 \pm 3.84\%$), en comparación con otras especies que también se encuentran en etapas iniciales de desarrollo de tecnología para su cultivo. Tal es el caso de la cabrilla arenera (*Paralabrax maculatofasciatus*), que presentó una supervivencia de 2.7% al ser destetada a los 17DDE (Civera-Cerecedo *et al.*, 2008). Anguas-Vélez *et al.* (2000), reportan supervivencias de tan sólo 1.7% y 2.7% al destetar larvas de pargo arenero (*P. maculatofasciatus*)# a los 25 y 30 DDE respectivamente.

Sin embargo, es importante mencionar que gracias a los avances recientes en el conocimiento de la capacidad digestiva de algunas especies se han logrado aumentar la supervivencia en los cultivos larvarios y obtener valores superiores a los obtenidos para totoaba en este experimento. Por ejemplo, Gatesoupe (2002) obtuvo el 60% de supervivencia en larvas de sol común (*Solea solea*); Zambonino-Infante y Cahu (2007) y Cahu *et al.* (2004) obtuvieron 47% de supervivencia en larvas de lubina europea (*D. labrax*); Fernández-Díaz *et al.* (1994), Bessonart *et al.* (1999), Kolkovski *et al.*, (1997), y Oliva-Teles (2000) reportaron más de 50% de supervivencia en larvas de dorada (*S. aurata*). Para el barramudi (*Lates calcarifer*), la máxima supervivencia fue del 84% (Curnow *et al.*, 2006). Estos resultados reflejan el esfuerzo que se ha realizado durante varios años de investigación sobre la fisiología digestiva y el cultivo larvarios de estas especies.

Otro factor determinante en la supervivencia durante el cultivo larvario de muchas especies de peces marinos, es la mortalidad causada por el efecto del canibalismo. Pese a que este estudio no fue diseñado para cuantificar con el efecto del canibalismo en la supervivencia final y no tenemos datos cuantitativos, se presentó éste comportamiento al analizar el contenido estomacal de ciertas larvas en las que se distinguía claramente la presencia de otra larva. Valverde (2002), menciona que en el caso de la corvina blanca, aproximadamente a partir de los 16 DDE se presenta una alta incidencia de canibalismo en los estanques de cultivo, mientras que para larvas de jurel (*S. lalandi*) de aproximadamente 10-12 mm (19DDE) comienzan a presentar un comportamiento agresivo que da origen al canibalismo, siendo el 42% de la población víctimas de este comportamiento (Kolkovski y Sakakura; 2004; Moran 2007). De igual manera larvas de vundu (*Heterobranchus longifilis*) presentan un comportamiento caníbal a partir de los 3DDE resultando en supervivencias de tan solo un 35.7% (Baras, 2000; Toko *et al.*, 2008). En el caso del lenguado de California (*Paralichthys californicus*) si no se separan los organismos por tallas, la mortalidad por canibalismo puede llegar a representar hasta un 50% de reducción en la población en 2 ó 3 días (Barón y Lazo, 2009).

En relación al factor de condición, para el destete tardío se estimó un valor de 0.180 y fue el único tratamiento que presentó una diferencia significativamente mayor que su respectivo control. Sin embargo, aunque no se presentó una diferencia significativa en relación a sus respectivos controles, tanto para el destete temprano (valor de 0.191) como para el intermedio (valor de 0.185) se estimaron valores superiores que su respectivo control.

Si consideramos a una misma especie y organismos de tallas similares, el incremento en el factor de condición nos puede indicar de una manera indirecta que las larvas y juveniles están en mejor condición; i.e., presentan un peso mayor en relación a su longitud, porque han logrado asimilar mejor la microdieta, como consecuencia de tener entre otros factores, un tracto digestivo más desarrollado y una mayor capacidad digestiva y de absorción de nutrientes. En el presente estudio las larvas destetadas presentaron un mayor factor de condición que sus respectivos controles, lo cual se puede atribuir entre otros factores a que durante el periodo de co-alimentación, la combinación de ambas dietas, logró satisfacer mejor los requerimientos nutricionales de las larvas.

VII.2. Efecto de atractantes sobre la tasa de ingestión de microdietas en larvas de jurel cola amarilla (*S. lalandi dorsalis*)

Las larvas de jurel cola amarilla aceptaron la microdieta desde muy temprana edad (5 DDE), lo cual sugiere que pueden ser destetadas desde muy temprana edad. Sin embargo, no se encontró un efecto claro de los atractantes sobre las tasas de ingestión a esta edad. Estos resultados son similares a los reportados por Brandt *et al.* (1987), quienes mencionan que las larvas de la perca atruchada (*Micropterus salmoides*) no fueron estimuladas por los aminoácidos libres alanina y betaína, utilizados normalmente como atractantes. Diversos autores mencionan que las larvas de peces marinos en etapas muy tempranas presentan órganos sensoriales inmaduros, por lo que se requieren cantidades mayores de atractantes para generar un estímulo apropiado (Kolkovski *et al.*, 2000; Koven *et al.*, 2001). En el presente estudio se utilizó una concentración de atractantes de 10^{-3} M. Es probable que un aumento en las concentraciones de atractantes en ésta etapa larvaria pueda causar un incremento en las tasas de ingestión en las larvas de jurel.

En el bioensayo realizado a los 10DDE, no se registró diferencia significativa en las tasas de ingestión entre los diferentes tratamientos, en donde el tratamiento con alanina resultó con las mayores tasas de ingestión (22.45 ± 0.474 µg de dieta por hora). Resultados similares han sido reportados por Harada (1992), quien encontró un incremento significativo en la tasa de ingestión, al utilizar alanina como atractante en las dietas para el jurel del Japón (*S. quinqueriata*). De manera similar, Koven *et al.* (2001), reportaron un aumento del 45% en el consumo de microdietas al utilizar alanina como atractante en bioensayos con larvas de dorada (*S. aurata*). Sin embargo, no en todas las especies tiene el mismo efecto, por ejemplo Papatryphon y Soares (2000), mencionan que la lubina rayada (*Morone saxatilis*) solo incrementó su tasa de

ingestión de microdietas en un 2.97% al ser expuesta a alanina. Con base en observaciones del comportamiento alimenticio, Yacoob y Browman (2007), mencionan que el larvas del lenguado del Atlántico (*H. hipoglossus*), comenzaron a nadar en círculos alrededor de una fuente de alanina, en busca de alimento.

En el bioensayo realizado a los 15 DDE, las larvas que recibieron la mezcla de atractantes tuvieron tasas de ingestión significativamente mayores en comparación con los otros tratamientos. Estos resultados concuerdan con trabajos en los que se demostró el efecto sinérgico de la mezcla de alanina, betaína, IMF y serina en la estimulación de los sentidos gustatorios y olfatorios que resultaron en mayores tasas de ingestión del alimento (Fletcher 1984; Yacoob y Browman, 2007). Papatryphon y Soares (2002), mencionan que para lograr alcanzar un estímulo similar de cada attractante por separado, se deben utilizar porcentajes mayores al 1% de la dieta, mientras que en la mezcla se utilizan porcentajes más bajos por attractante (i.e., alanina 0.4% de la dieta; serina, 0.6%; betaína, 0.4% y 0.3% para IMF).

El incremento en las tasas de ingestión a los 15 DDE utilizando la mezcla de atractantes, se pudo deber al efecto sinérgico entre los diversos atractantes y a la buena palatabilidad que generan (Papatryphon y Soares 2001; Yacoob y Browman, 2007). Por ejemplo, en experimentos realizados en lubina rayada, obtuvieron tasas de ingestión similares al utilizar esta mezcla de atractantes en microdietas a base de componentes vegetales y compararlas con una dieta a base de harina de pescado (Papatryphon y Soares, 2000; 2001). De manera similar, Koven *et al.* (2001), mencionan que la dorada (*S. aurata*) aumenta su tasa de ingestión en un 120% en comparación a la dieta basal (sin atractantes), al haber sido expuestas a una mezcla de atractantes similar a la utilizad en este estudio.

En los resultados obtenidos en el bioensayo realizado 20 DDE, se observó que las larvas que recibieron el attractante a base de betaína fueron las que obtuvieron las tasas de ingestión más altas. Sin embargo, no se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos. La betaína es una base orgánica

encontrada en grandes concentraciones en extractos de zooplancton (crustáceos), y se ha sugerido como un gran estimulante en los receptores del sabor y comportamiento alimenticio en peces (Carr *et al.*, 1996; Yacoob y Browman, 2007). Hughes (1990), reportó un aumento significativo en las tasas de ingestión en larvas del salmón del atlántico (*Salmo salar*) en comparación con tratamientos sin betaína. De manera similar, Harada (1992) reporta que el misgurno de Asia (*Misgurnus anguillicaudatus*), incrementó de manera significativa ($3 \mu\text{g}$ alimento hora⁻¹) la tasa de ingestión de microdietas al ser estimulado con betaína adicionada a la dieta.

Sin embargo, algunos autores como Mackie y Mitchel (1985), Yacoob y Browman (2007), recomiendan el uso de la betaína de manera conjunta con ciertos aminoácidos y así lograr un estímulo apropiado. Kiyohara y Hidaka (1991) mencionan que la betaína y los aminoácidos se unen a receptores independientes, por lo que no compite por los la unión a receptores y puede incrementar la respuesta estimulante en combinación con los aminoácidos. Estos autores lograron incrementar las tasas de ingestión de una manera significativa en comparación con su control, en el sol europeo (*S. solea*) y del lenguado del Atlántico (*H. hippoglossus*) al usar una combinación de atractantes de betaína y alanina. Esto contrasta con lo encontrado en el presente experimento, en donde la betaína y la mezcla de atractantes presentaron niveles prácticamente similares, siendo la variabilidad de los datos un factor determinante en la aparente falta de estímulo por parte de la betaína.

Es importante mencionar que por causas ajenas a nuestro control, la microdieta fabricada con las microesferas fluorescentes tenía una cantidad baja de betaína. La microdieta utilizada continúa en su etapa experimental por parte del Dr. D´Abramo, quien consideró pertinente respetar la formulación original. La presencia de la betaína en la formulación basal de la microdieta pudo tener un efecto estimulante suficiente para enmascarar el efecto positivo de algún otro atractante utilizado y no puede ser descartado. Sin embargo, como se mencionó

anteriormente Kiyohara y Hidaka (1991), reportan que en juveniles de lubina rayada (*M. saxatilis*), la betaína se une a receptores independientes de los de los aminoácidos, y que incluso mejora la respuesta atractante de los aminoácidos.

Los experimentos a largo plazo (30 días o más) pueden describir mejor el efecto de los atractantes con relación al crecimiento (Koven *et al.*, 2001). No obstante, se ha sugerido que el uso de atractantes por un tiempo prolongado reduce su eficacia, especialmente cuando se usan concentraciones superiores a las necesarias para generar un estímulo por parte de los quimiorreceptores (Papatryphon y Soares, 2000). Kolkovski *et al.* (1997), mencionan que es razonable asumir que la dependencia de un sistema a base de estímulos químicos rudimentarios por parte de la larva, disminuye cuando la larva desarrolla habilidades de caza. Sin embargo, en el presente estudio no se logró establecer un patrón claro del efecto de los atractantes durante la ontogenia de las larvas de jurel y aún quedan muchos estudios por realizar.

VIII. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

VIII.1. Totoaba

Se logró un destete adecuado en larvas de totoaba a una edad temprana (17 DDE)

Se obtuvo el mejor crecimiento y factor de condición en las larvas de totoaba sometidas a un destete temprano (17DDE) comparado con el destete a los 22 y 27 DDE.

Las larvas de totoaba, pueden ser destetadas de una manera exitosa a los 17DDE, evitando así el uso de Artemia en el cultivo, lo que reflejará una mejor rentabilidad del cultivo larvario.

VIII.2. Jurel

Se logró desarrollar y establecer un protocolo para cuantificar las tasas de ingestión de microdietas en larvas de jurel colar amarilla mediante el uso de microesferas como marcador inerte. Esta técnica es una buena herramienta que permite evaluar de una manera apropiada las tasas de ingestión en larvas de peces marinos.

No se encontró un efecto claro y consistente de los atractantes en las tasas de ingestión de las microdietas.

IX. BIBLIOGRAFIA

- Alarcón F., F. Moyano y M. Díaz. 2002. Evaluation of different protein sources for aquafeeds by an optimized pH-stat system. *Journal of the Science of food and Agriculture*. 82: 1-8.
- Anderson J., S. Lall, D. Anderson y M. McNieven. 1993. Evaluation of protein quality in fish meals by chemical and biological assay. *Aquaculture* 115: 305-325.
- Anguas-Vélez B. H., R. Civera-Cerecedo, M. Contreras-Olguín, R.A. Rueda-Jasso y J. Guillaume. 2000. Preliminary study on the timing of weaning of spotted sand bass (*Paralabrax maculatofasciatus*) larvae with a prepared diet: effects on growth and survival. *Journal of Applied Aquaculture* 10: 1–15.
- Arredondo Figueroa J. L., Zabalegui Medina L. M., Espinosa Aranda J. L., Campos Verduzco R., Hernández Espíndola L. C. 1994. Desarrollo científico y tecnológico del cultivo de jurel. Secretaria de Pesca. Convenio SEPESCA-IMIT, A. C. México, D. F., México. 62p.
- Avilés-Quevedo A., Castelló-Orvay, F., 2004. Manual para el cultivo de *Seriola lalandi* (pisces: Carangidae) en Baja California Sur, México., Instituto Nacional de Pesca. Dirección General de Investigación en Acuicultura. Secretaría de Acuicultura, Ganadería, Desarrollo rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA). Pág.1-64.
- Baras E., M.Y.J. Maxi, M. Ndao y C. Melard. 2000. Sibling cannibalism in dorada under experimental conditions. Effect of initial size heterogeneity, diet and light regime on early cannibalism. *Journal of Fish Biology* 57: 1021-1036.
- Barón Sevilla, B. y J. P. Lazo Corvera. 2009. Desarrollo biotecnológico del lenguado *Paralichthys californicus* en Baja California, México. En: "Sustentabilidad y Pesca Responsable en México: evaluación y manejo". Instituto Nacional de Pesca. En prensa.
- Bengston D.A. 1993. A comprehensive program for the evaluation of artificial diets. *Journal of the World Aquaculture Society*. 24: 285-293.
- Benetti Daniel D. 1997. Spawning and larval husbandry of flounder (*Paralichthys woolmani*) and Pacific Yellowtail (*Seriola mazatlanana*), new candidate species for aquaculture. *Aquaculture* vol. 155: 307-318.

- Berdegú A.J. 1955. La pesquería de la totoaba (*Cynoscion macdonaldi*), en San Felipe, Baja California. Revista de la Sociedad Mexicana de Historia Natural 16(1-4): 45-78.
- Berdegú A.J. 1956. Peces de importancia comercial en la costa noroccidental de México. Secretaría de Marina. Dirección General de Pesca e Industrias Conexas.
- Bessonart M., M.S. Izquierdo, M. Salhi, C.M. Hernández-Cruz, M.M. González, y H. Fernández-Palacios. 1999. Effect of dietary arachidonic acid levels on growth and survival of gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.) larvae. Aquaculture 179:265–275.
- Bjelland R. y A. Skiftesvik. 2006. Larval development in European hake (*Merluccius merluccius*) reared in a semi-intensive culture system. Aquaculture Research, 2006, 37, 1117-1129.
- Brandt T.M., R.M. Jones y R.J. Anderson. 1987. Evaluation of prepared feeds and attractants for largemouth bass. Prog. Fish-Cult. 49: 198-203.
- Brown M. R., S. W. Jeffrey y C. D. Garland. 1989. Nutritional aspects of microalgae used in mariculture, a literature review. CSIRO Marine Laboratories Report 205.
- Burke J.S., T. Seikai, Y. Tanaka y M. Tanaka. 1999. Experimental intensive culture of summer flounder, *Paralichthys dentatus*. Aquaculture. 176 (1-2): 135-144.
- Cahu C., I. Rønnestad, V. Grangier y J.L. Zambonino Infante. 2004. Expression and activities of pancreatic enzymes in developing sea bass larvae (*Dicentrarchus labrax*) in relation to intact and hydrolyzed dietary protein; involvement of cholecystokini. Aquaculture. 238: 295- 308.
- Cahu C. y J.L. Zambonino-Infante. 2001. Substitution of live food by formulated diets in marine fish larvae. Aquaculture 200: 161-180.
- Cahu C. y J.L. Zambonino-Infante. 1994. Early weaning of sea bass (*Dicentrarchus labrax*) larvae with a compound diet: effect on digestive enzymes. Comp Biochem Physiol 109A(2): 213–222.
- Cannon R. 1966. The Sea of Cortés. Lane Magazine and Book Co., Menlo Park, Calif.
- Carr W., J. Netherton III, R. Gleeson y C. Derby. 1996. Stimulants of feeding behavior in fish: analyses of tissues of diverse marine organism. Biol. Bull. 190: 149-160.

- Carton A. 2005. The impact of light intensity and agal-induced turbidity on fist-feeding *Seriola lalandi* larvae. *Aquaculture Research* 36: 1588 – 1594.
- Chen B. N., J.G. Qin, M.S. Kumar, W. Hutchinson. y S. Clarke. 2006. Ontogenic development of the digestive system in yellowtail kingfish *Seriola lalandi* larvae. *Aquaculture*. 256: 489-501.
- Chen B. N., J.G. Qin, M.S. Kumar, W. Hutchinson y S. Clarke. 2006. Ontogenic development of the digestive enzymes in yellowtail kingfish *Seriola lalandi* larvae. *Aquaculture*. 260: 264-271
- Chong A.S.C., R, Hashim, y A.B. Ali. 2002. Assessment of dry matter and protein digestibilities of select raw ingredients by discus fish (*Symphysodon aequifasciata*). *Aquaculture Nut.* 8 (3): 229-238.
- Chu FL. y S. Ozkizilcik. 1999. Acceptability of complex microencapsulated diets by striped bass (*Morone saxatilis*) larvae. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*. 237: 1-9.
- Chute G.R. 1928. The totuava fishery of the California Gulf. *Calif. Fish Game*. 14:275-281.
- Cisneros-Mata M.A., G. Montemayor-López y M.J. Román-Rodríguez. 1995. Life history and conservation of *Totoaba macdonaldi*. *Conservation Biology*. 9(4): 806-814.
- Civera-Cerecedo R., C. Álvarez-González, R.E. García -Gómez, V. Carrasco-Chávez, J. Ortiz-Galindo, M. Rosales-Velázquez y T. Grayeb-Del Álamo. 2008. Effect of Microparticulate Diets on Growth and Survival of Spotted Sand Bass Larvae, *Paralabrax maculatofasciatus*, at Two Early Weaning Times. *Journal of the World Aquaculture Society*. Vol. 39, No. 1.
- Civera-Cerecedo R., C.A. Álvarez-González y F.J. Moyano-López. Nutrición y alimentación de larvas de peces marinos 2004. En: Cruz Suárez, L.E., D. Ricque Marie, M.G. López Nieto, D. Villarreal, U. Scholz y M. González (eds.). *Avances en nutrición acuícola VII. Memorias del VII Simposium Internacional de Nutrición Acuícola*. 16 – 19 Noviembre. Hermosillo, Sonora, México. 8 – 94.
- Conklin D., G.E. Piedrahita, J.B. Merino, D.E. Muguet, E. Bush, E. Gisbert, J. Rounds y M. Cervantes-Trujano. 2003. Development of California halibut *Paralichthys californicus* culture. *Journal Appl. Aquac.* 14 (3/4): 143-154.
- Curnow J., J. King, J. Bosmans, S. Kolkovski. 2006. The effect of reduced *Artemia* and rotifer use facilitated by a new microdiet in the rearing of barramundi *Lates calcarifer* (BLOCH) larvae. *Aquaculture* 257: 204–213.

- Daniels H.V. 2000. Species profile. Southern flounder. SRAC. Publication No. 726.
- Engrola S., L. Concencao, L. Dias, R. Pereira, L.Ribeiro y M.T. Dinis. 2007. Improving weaning strategies for Senegalese sole: effects of body weight and digestive capacity. *Aquaculture Research*, 38, 696-707.
- Evjemo J.O., K. I. Reitanb y Y. Olsena. 2003. Copepods as live food organisms in the larval rearing of halibut larvae (*Hippoglossus hippoglossus* L.) with special emphasis on the nutritional value. *Aquaculture*. 227 (1-4): 191-210.
- FAO. 2004 2006. Estado mundial de la pesca y la acuicultura 2006. www.fao.org. Septiembre 2009.
- Fischer W., F. Krupp, W. Schneider, C. Sommer, K.E. Carpenter y V.H. Niem. 1995. Guía FAO para la identificación de especies para los fines de la pesca. 3: 1427-1518.
- Flanagan C.A. y J.R. Hendrickson. 1976. Observations on the commercial fishery and reproductive biology of the totoaba, *Cynoscion macdonaldi*, in the northern Gulf of California. *Fishery Bulletin*. 74:531-544.
- Fletcher D.J. 1984. The physiological control of appetite in fish. *Comp. Biochem. Physiol.* Vol. 78A, No. 4: 617-628.
- Frey H.W. 1971. California's living marine resources and their utilization. Calif. Dept. Fish Game. 148 p.
- Galaviz M., L. López, A. García y C. True. Expression and activity of three digestive proteases in totoaba (*Totoaba macdonaldi*) larvae during development. En: Cruz-Suárez L.E., D. Rique-Marie, M. Tapia-Salazar, M. Nieto-López, D. Villareal-Cavazos y J. Gamboa-Delgado (Eds.). *Memorias del X Simposium Internacional de Nutrición Acuícola 08-10 Noviembre*. San Nicolas de los Garza, Nuevo León. México.
- García-Gómez F. 2009. Evaluación de fuentes proteicas por medio de digestibilidad *in vivo* e *in vitro* para elaboración de dietas de juveniles de jurel, *Seriola lalandi dorsalis*. Tesis de maestría. Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada. 55 p.
- García-Ortega A., I. Abdo y C. Hernández. 2003. Weaning of bullseye puffer (*Spheroides annulatus*) from live food to microparticulate diets made with decapsulated cyste of *Artemia* and fishmeal. *Aquaculture International* 11: 183-194.
- Gatesoupe F. 2002. Probiotic and formaldehyde treatments of *Artemia* nauplii as food for larval pollack, *Pollachius pollachiu*. *Aquaculture* 212: 347-360.

- Gisbert E., Conklin D.B. y R.H. Piedrahita. 2004. Effects of delayed first feeding on the nutritional condition and mortality of California halibut larvae. *Journal of Fish Biology* 64: 116 -132.
- Gisbert E., R.H. Piedrahita y D.E. Conklin. 2003. Ontogenic development of the digestive system in California Halibut (*Paralichthys californicus*) with notes on feeding practices. *Aquaculture* 232 (1-4): 455-477.
- Grant P.T. y A.M. Mackie. 1974. Chemoreception in marine organisms. Academic Press Inc. London, pp: 295
- Guérin M. 2000. Uso de Betaína en Alimentos Acuícolas: Atractante, Osmoregulador ó Metabolito Lipotrófico?. En: Cruz-Suárez L.E., D. Rique-Marie, M. Tapia-Salazar, M.A. Olvera-Novoa y R. Civera-Cerecedo (Eds.). *Avances en Nutrición Acuícola IV. Memorias del V Simposium Internacional de Nutrición Acuícola* Noviembre 15-18, 1998. La Paz, B.C.S., México.
- Hamre K., I. Opstad, M. Espe, J. Solbakken, G.I. Hemre y K. Pittman. 2002. Nutrient composition and metamorphosis success of Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*, L.) larvae fed natural zooplankton or Artemia. *Aquaculture Nut.* 8 (2): 139-148.
- Hara T. 1975. Olfaction in fish. *Progress in Neurobiology*. Vol 5. Part 4. 271 p.
- Harada K., 1992. Effect of attractant and repellent mixtures on behavior of the oriental weatherfish *Misgurnus anguillicaudatus*. *Nippon Suisan Gakkaishi* 58: 1427-1430.
- Herrera M., I. Hachero-Cruzado, E. Catarina, J. Ferrer, J. Márquez, M. Rosano y J. Navas. 2010. Weaning of the wedge sole *Dicologlossa cuneata* (Moreau): influence of initial size on survival and growth. *Aquacult Int.* 18: 475-485.
- Herrero C., Cid, A., Fabregas, J., Abalde, J. 1991. Yields in biomass and chemical constituents of four commercially important marine microalgae with different culture media. *Aquacult. Eng.* 10: 99-110.
- Hamza N y M. Mhetli. 2007. Effects of weaning age and diets on ontogeny of digestive activities and structures of pikeperch (*Sander lucioperca*) larvae. *Fish Physiol Biochem* 33: 121-133.
- Hughes G. 1990. Effects of aqueous amino acid solutions on the feed intake of juvenile Atlantic salmon. *Salmonid* 13: 13-14.
- Holt G.J. 1993. Feeding larval red drum on microparticulate diets in closed recirculating water system. *J. World Aquac. Soc.* 24: 225-230.

- Ikenoue H., y T. Kafuku. 1992. Modern Methods of Aquaculture in Japan. 2nd Ed., Kodansha, Tokio and Elsevier, Amsterdan, 274 p.
- Izquierdo M.S., J. Socorro, L. Antzamendi y C.M. Hernandez-Cruz. 2000. Recent advances in lipid nutrition in fish larvae. *Fish Physiol Biochem*, 22: 97–107.
- Jones D., M.S. Kamarudin y L. Le Vay. 1993. The Potential Replacement of Live Feeds in Larval Culture. *Journal of World Aquaculture Society*. Vol. 24: 199-210.
- Kawamura T., D. Roberts, H. Takami y C. M. Nicholson. 1997. Feeding habitats of post-larval abalone *Haliotis discus hannai* and *Haliotis iris*. Abstract. Third International Abalone Symposium, Biology, Fishers and Culture. October 26-31, Monterey, California USA.
- Kiyohara S. e I. Hidaka. 1991. Receptor sites for alanine, proline and betaine in the palatal taste system of the puffer, *Fugu pardalis*. *Journal of Comparative Physiology* 169A: 523-530.
- Knutsen J.A. 1992. Feeding behavior of North Sea turbot (*Scophthalmus maximus*) and Dover sole (*Solea solea*) larvae elicited by chemical stimuli. *Mar Biol*, 113: 543–548.
- Kolkovski S., J.P. Lazo, D. Leclercq y M. Izquierdo. 2009. Marine fish larval nutrition and diets: new developments. Review (en prensa)
- Kolkovski S. y Y. Sakakura. 2004. En: L.E. Cruz-Suárez, D. Rique-Marie, M. Tapia-Salazar, M.A. Olvera-Novoa y R. Civera-Cerecedo (Eds.). *Avances en Nutrición Acuícola VII. Memorias del VII Simposium Internacional de Nutrición Acuícola 16-19 noviembre, Hermosillo. Sonora, México.*
- Kolkovski S. 2001. Digestive enzymes in fish larvae and juveniles-implications and applications to formulated diets. *Aquaculture* 200: 181–201.
- Kolkovski S., S. Czesny y K. Dabrowski. 2000. Use of krill hydrolisate as a feed attractant for flat fish larvae and juveniles. *Journal of the World Aquaculture Society*. Vol. 31. No. 1.
- Kolkovski S., A. Arieli y A. Tandler. 1997. Visual and chemical cues stimulate microdiet ingestion in seabream larvae. *Aquacult. Int.* 5: 527-536.
- Kolkovski S., W. Koven y A. Tandler. 1997. The mode of action of Artemia in enhancing utilization of microdiets by gilthead seabram *Spaurus aurata* larvae. *Aquaculture* 155: 193-205.

- Kolkovski S., A. Tandler, G. Kissil y A. Gertler. 1993. The effect of dietary exogenous digestive enzymes on ingestion, assimilation, growth and survival of gilthead seabream *Sparus aurata*, Sparidae, Linnaeus larvae. *Fish Physiol. Biochem.* 12: 203–209.
- Koven W., C.R. Rojas-García, R.N. Finn, A. Tandler e I. Rønnestad. 2002. The stimulatory effect of ingested protein and/or free amino acids on the secretion of the gastro-endocrine hormone, cholecystokinin (CCK) and the protease, trypsin, in first feeding herring larvae, *Clupea harengus*. *Mar. Biol.* 140: 1241–1247.
- Koven W., S. Kolkovski, E. Hadas, K. Gamisiz y Tandler A. 2001. Advances in the development of microdiets for gilthead seabream, *Sparus aurata*: a review. *Aquaculture* 194: 107-121.
- Kubitza F., L. Lovshin y Lovell R. 1997. Identification of feed enhancers for juvenile largemouth bass *Micropterus salmoides*. *Aquaculture* 148: 191-200.
- Lamb C. 2001. Gustation and feeding behavior. In: Food intake in fish. Editado por Houlihan D., T. Boujard y M. Jobling. Ed. Blackwell Science. pp 442.
- Lauff M. y R. Hofer. 1984. Proteolytic enzymes in fish developed and the importance of dietary enzymes. *Aquaculture* 37: 335–346.
- Lavín, M.F. y S. Sánchez. 1999. How the Colorado river affected the hydrography of the upper Gulf of California. *Continental Shelf Research.* 19:1545-1560.
- Lazo J.P. 2000. Conocimiento actual y nuevas perspectivas en el desarrollo de dietas par larvas de peces marinos. En: Cruz-Suárez L.E., D. Rique-Marie, M. Tapia-Salazar, M.A. Olvera-Novoa y R. Civera-Cerecedo (Eds.). *Avances en Nutrición Acuícola V. Memorias del V Simposium Internacional de Nutrición Acuícola 19-22 Noviembre, Mérida. Yucatán, México.*
- Lazo Corvera, J. P., E. Martínez Montaña, R. A. Montes Macías, P. Sylvia y M. A. Drawbridge. 2007. Developing diets for weaning Pacific yellowtail (*Seriola lalandi dorsalis*) based on larval digestive physiology and selection of protein sources for juvenile growout diets. En *Caribbean & Latin American Aquaculture 2007 Del 06 al 09 de noviembre. San Juan, Puerto Rico. World Aquaculture Society.* p 65.
- Lazo J.P., R. Mendoza, G.J. Holt, C. Aguilera y C.R. Arnold. 2007. Characterization of digestive enzymes during larval development of red drum (*Sciaenops ocellatus*). *Aquaculture* 265: 194-205.
- Lazo J.P., G.J. Holt y C.R. Arnold. 2000. Ontogeny of pancreatic enzymes in larval red drum *Sciaenops ocellatus* *Aquaculture nut.* 6: 183-192.

- Lazo J.P., M.T. Dinis, G.J. Holt, C. Faulk y C.R. Arnold. 2000. Co-feeding microparticulate diets with algae: toward eliminating the need of zooplankton at first feeding in larvae red drum (*Sciaenops ocellatus*). *Aquaculture* 188: 339-351.
- Le Ruyet J.P., J.C. Alexandre, L. Thébaud y C. Mugnier. 1993. Marine Fish Larvae Feeding: Formulated Diets or Live Prey?. *Journal of World Aquaculture Society*. Vol. 24: 211-224.
- Lee G, y M. Litvak. 1996. Weaning of methamorphosed winter flounder (*Pleuronectes americanus*) reared in the laboratory: comparison of two commercial artificial diets on growth, survival and conversion efficiency. *Aquaculture* 144: 251-263.
- Mackie A.M. y A.I. Mitchell. 1985. Identification of gustatory feeding stimulants for fish applications in aquaculture. En: Cowey, C.B., A.M. Mackie y G.J. Bell, G.J. (Eds.). *Nutrition and Feeding in Fish*. Academic Press, London, pp. 177-190.
- Mandich A., Massari A., Bottero S., Pizzicori P., Goos H., Marino G. 2004. Plasma sex steroid and vitellogenin profiles during gonad development in wild Mediterranean amberjack (*Seriola dumerili*). *Marine Biology* 144:127-138.
- Manooch C. S. 1983. Foods of greater amberjack, *Seriola dumerili*, and almaco jack, *Seriola rivoliana* (Pisces. Carangidae) from the south Atlantic Bight. *The J. of the Elisha Mitchell Scientific Society* 99:1-9.
- Martinez E. 2007. Digestibilidad proteica en el lenguado de California (*Paralichthys californicus*): ontogénesis y comparación de dos métodos de evaluación in vitro. Tesis de maestría. Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada.
- Montes R. 2007. Caracterización de la actividad enzimática de larvas de jurel cola amarilla del pacífico (*Seriola lalandi dorsalis*). Tesis de maestría. Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada.
- Morales-Ortíz C. 1999. Descripción del desarrollo embrionario de totoaba (*Totoaba macdonaldi*) bajo condiciones de laboratorio. Tesis de licenciatura, Universidad Autónoma de Baja California, Ensenada, B.C., México, 56 pp.
- Moran D. 2007. Size heterogeneity, growth potential and aggression in juvenile yellowtail kingfish (*Seriola lalandi valenciennes*). *Aquaculture Research* 38: 1254 - 1264.

- Muashita K., Kubota S., Kofuji P. Y. M., Hosokawa H. and Masumoto T. 2005. Trypsin restoration time in the pyloric ceca of yellowtail *Seriola quinqueradiata*. *Fish science* 71:1274-1279.
- Muguet J., J.P. Lazo, C. Douglas y R. Piedrahita. 2010. Evaluation of Weaning Performance of California Halibut (*Paralichthys californicus*) Larvae Using Growth, Survival and Digestive Proteolytic Activity. *Aquaculture Nutrition*. doi: 10.1111.
- Muscato Hansen J., J.P. Lazo y L.J. Kling . 2009. A method to determine protein digestibility of microdiets for larval and post-larval fish. *Aquaculture Nutrition*. 15:615-626.
- Nakada M. 2008. Yellowtail Culture Development and Solutions for the Future . *Reviews in Fisheries Science* 10 (3-4). 575 p.
- Nevitt G. 1991. Do fish sniff? A new mechanism of olfactory sampling in pleuronectid flounders. *J. Exp. Biol.* 157, 1-18 (1991)
- Norma Oficial Mexicana (NOM-ECOL 059-94). Norma que determina las especies y subespecies de flora y fauna silvestres, terrestres y acuáticas en peligro de extinción, amenazadas, raras y las sujetas a protección especial. Establece especificaciones para su protección. Instituto Nacional de Ecología (INE). Consulta en Internet: http://ine.gob.mx/dgra/normas/rec_nat/no_059.htm.
- Oliva-Teles A. 2000. Recent advances in European sea bass and gilthead sea bream nutrition. *Aquaculture International* 8:477-492.
- Ostaszewska T., K. Dabrowski, K Czuminska, W. Olech y M. Olejniczak. 2005. Rearing of pikeperch larvae using formulated diets-first success with starter feed. *Aquaculture Research* 26: 1167-1176.
- Papatryphon E. y J.H. Soares. 2002. A Qualitative and Quantitative approach to determine the optimum combination of feeding stimulants for striped bass *Morone saxatilis* using an agar gel carrier. *Journal of the World Aquaculture Society*. Vol. 33. No. 1: 23-31.
- Papatryphon E. y J.H. Soares. 2001. Optimizing the levels of feeding stimulants for use in high-fish meal and plant feedstuff-based diets for striped bass, *Morone saxatilis*. *Aquaculture* 202: 279-288.
- Papatryphon E. y Soares J.H. 2000. The effect of dietary feeding stimulants on growth performance of striped bass, *Morone saxatilis*, fed-a-plant feedstuff-based diet. *Aquaculture* 185: 329-338.

- Person Le-Ruyet J.C. Alexandre, L. Thébaud, y C. Mugnier, C. 1993. Marine fish larvae feeding: Formulated diets or live prey?. *Journal of the World Aquaculture Society*. 24(2): 211–224.
- Poortenaar C., A. Jeffs y S. Hooker. 2003. Commercial opportunities for Kingfish aquaculture in Northland. National Institute of Water and Atmospheric Research Ltd. Pp. 1-45.
- Primary Industries and Resources SA (PIRSA) 2000. Yellowtail kingfish aquaculture in SA. www.pir.sa.gov.au. South Australian 2002. Yellowtail Kingfish Aquaculture in SA. Aquaculture SA.
- Reutter K. y M. Witt. 1993. Morphology of vertebrate taste organs and their nerve supply. In: *Mechanisms of Taste Transduction*. Ed. S.A. Simon y S.D. Roper. CRC Press, Boca Ratón. pp. 29–82.
- Ribeiro L., S. Engrola y M.T. Dinis. 2005. Weaning of Senegalese sole (*Solea senegalensis*) postlarvae to an inert diet with a co-feeding regime. *Ciencias Marinas*, 31(2): 327–337.
- Robin J.H. y B. Vincent. 2003. Microparticulate diets as first food for gilthead sea bream larva (*Sparus aurata*): study of fatty acid incorporation. *Aquaculture* 225: 463-474.
- Rodríguez M. 2003. Composición proximal y contenido de ácidos grasos en juveniles de *Totoaba macdonaldi* del alto golfo de California. Tesis de Maestría .Universidad Autónoma de Baja California. Facultad de ciencias marinas. 75 p.
- Roselund G, J Stoss y C. Talbot. 1997. Co-feeding marine fish larvae with inert and live diets. *Aquaculture* 155:183–191.
- Ruíz-Durá M.F. 1980. Recursos pesqueros de las costas de México. Ed. Limusa, 208 pp.
- Rust M.B. 2002. Nutritional physiology. En *Fish Nutrition*. Halver J. E. Ed. Hardy R. W. Academic Press. Amsterdam. 367–452.
- Saguira S.H. 2000. Digestibility. En R.R. Stickney (ed.) *Encyclopedia of aquaculture*. John Wiley and Sons, Inc. USA 209-218 p.
- Sandoval-Garibaldi G. 2001. Desarrollo morfológico de la totoaba (*Totoaba macdonaldi*) (Gilbert, 1890) durante su estadio larval en condiciones de laboratorio. Tesis de licenciatura, Universidad Autónoma de Baja California, Ensenada, B.C., México. 75 p.

- Schwartz A., L. Wang, E. Early, A. Gaigalas, Y. Zhang, G. Marti y R. Vogt. 2002. Quantitating Fluorescence Intensity from Fluorophore: The Definition of MESF Assignment. *J. Res. Natl. Inst. Stand. Technol.* 107:83–91.
- Skaramuca B., Kozul V., Teskeredzic Z., Bolotin J. y Onofri V. 2001. Growth rate of tank-reared Mediterranean amberjack, *Seriola dumerili* (Riso 1810) fed on three different diets. *J. Appl. Ichthyol.* 17: 130-133.
- Solorzano Y. 2006. Efecto de niveles de alimentación sobre el crecimiento y composición química de juveniles de *Totoaba macdonaldi*. Tesis de Maestría. Universidad Autónoma de Baja California. Facultad de ciencias marinas.
- Takeda M. y K. Takii. 1992. Gustation and nutrition in fishes: application to aquaculture. In: *Fish Chemoreception* Ed. Chapman & Hall, London. pp. 287.
- Takeuchi T., Q. Wang, H. Furuita, T. Hirota, S. Ishida y H. Hayasawa. 2003. Development of microparticle diets for Japanese flounder *Paralichthys olivaceus* larvae. *Fish. Sci.* 69: 547-554.
- Talamás E. 2001. Efecto de la temperatura sobre la preferencia térmica y el metabolismo de juveniles de *Totoaba macdonaldi* (GILBERT, 1890) (PISCES: SCIAENIDAE). Tesis de maestría. Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada.
- Tashima S. M. Ishikawa y S. Koshio. 2000. Nutritional assessments and feed intake of micro particulated diets in crustaceans and fish. *Aquaculture Research* 31: 691-702.
- Toko I., E. Fiogbe y P. Kestemont. 2008. Determination of appropriate age and stocking density of vundu larvae, *Heterobranchus longifilis* (Valenciennes 1840), at the weaning time. *Aquaculture Research*, 39, 24-32.
- True C.D., N. Castro-Castro, G. Sandoval-Garibaldi y C. Morales-Ortiz. 2001. Reproducción Controlada de *Totoaba macdonaldi* (Gilbert). Resumen de ponencia oral del VII Congreso de la Asociación de Investigadores del Mar de Cortés. Pag. 82.
- True C.D., A. Silva Loera y N. Castro Castro. 1997. Acquisition of *Totoaba macdonaldi* (Sciaenidae) broodstock: field handling, decompression and prophylaxis of an endangered species. *Progressive Fish-Culturist.* 59(3).
- Valverde S. 2002. Desarrollo del sistema digestivo de larvas de Corvina blanca, *Atractoscion nobilis* (Ayres, 1860) (SCIAENIDAE), y selección de fuentes

- proteicas adecuadas para su alimentación. Tesis de maestría. Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada. 109 p.
- Villareal G., B. Barón, C. True y J.P. Lazo. 2010. Efecto de la concentración de HUFA's n-3 en la dieta sobre el crecimiento, supervivencia eficiencia alimenticia y condición de salud en juveniles de totoaba (*Totoaba macdonaldi*). En: Cruz-Suárez L.E., D. Rique-Marie, M. Tapia-Salazar, M. Nieto-López, D. Villareal-Cavazos y J. Gamboa-Delgado (Eds.). Memorias del X Simposium Internacional de Nutrición Acuícola 08-10 Noviembre. San Nicolas de los Garza, Nuevo León. México.
- Vizcaíno E. 2008. Efecto en el crecimiento, consumo, sobrevivencia y composición proximal de juveniles de *Totoaba macdonaldi*, alimentados con dietas isproteicas formuladas con distintos niveles de energía. Tesis de Maestría. Universidad Autónoma de Baja California. Facultad de ciencias marinas.
- Walford J. y T.J. Lam. 1993. Development of the digestive tract and proteolytic enzyme activity in seabass (*Lates calcarifer*) larvae and juveniles. *Aquaculture*.109:187-205.
- Williams J. E. 2000. The Coefficient of Condition of Fish. Manual of fisheries survey methods II: with periodic updates (Chapter 13). Editado por James C Schneider. Michigan Department of Natural Resources Special Report 25.
- Wullimann M.F. 1997. The central nervous system. In: *The Physiology of Fishes*. Ed. D.H. Evans. CRC Press, Boca Raton. 2nd edición. pp. 245–282.
- Yacoob S.Y. y H.I. Browman. 2007. Olfactory and gustatory sensitivity to some feed-related chemicals in the Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*). *Aquaculture* 263: 303-309.
- Yacoob S.Y. y H.I. Browman. 2007. Prey extracts evoke swimming behavior in juvenile Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*). *Aquaculture* 270: 570-573.
- Yamamoto M., y K. Ueda. 1979. Comparative morphology of fish olfactory epithelium. X. Perciformes. Beryciformes. Scorpaeniformes and leuronectiformes. *J. Fac. Sci. Tokyo Univ.*14, 273-297.
- Zacarías-Soto M., J.B. Muguet, J.P. Lazo. 2006. Protelytic activity in California Halibut Larvae (*Paralichthys californicus*). *Journal of World Aquaculture Society* 37 (2): 175-185.
- Zambonino-Infante J.L. y Cahu C. 2007. Dietary modulation of some digestive enzymes and metabolic processes in developing marine fish: Applications to diet formulation. *Aquaculture* 268: 98-105

Zambonino-Infante J.L. y Cahu C. 2001. Ontogeny of the intestinal tract of marine fish larvae. *Biochem. Physiol.* 130: 477-487.

Zar J.H. 1984. *Bioestatistical Analysis*. Ed. Prentice Hall. Englewood Cliffs, New Jersey. USA. pp. 334.

X. ANEXO

X.1. Curva de calibración para determinar la tasa de ingestión.

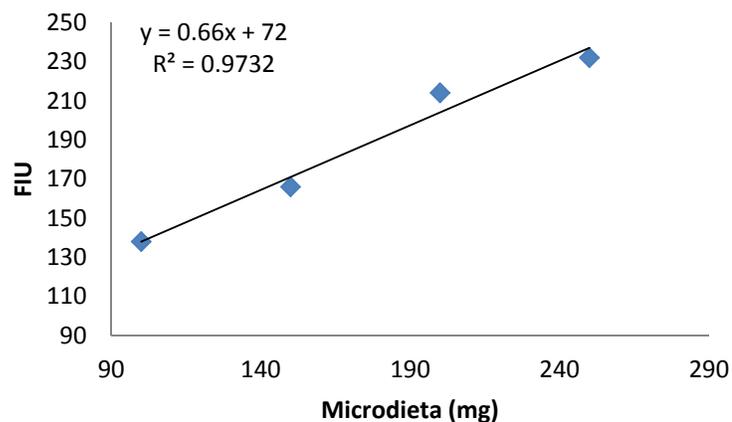


Figura 25. Curva de calibración utilizada para determinar la tasa de ingestión en base al número de fluoroesferas ingeridas por las larvas.

X.2. Curva de calibración para determinar la fluorescencia en base a unidades de Fluoresceína.

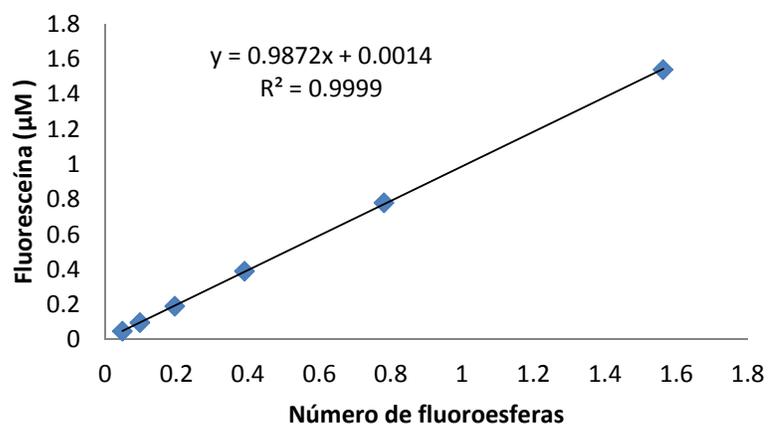


Figura 26. Curva de calibración para determinar la cantidad de fluorescencia presente en las microesferas en base a unidades de fluoresceína

X.3. Curva de calibración para determinar la fluorescencia presente en las microesferas fluorescentes.

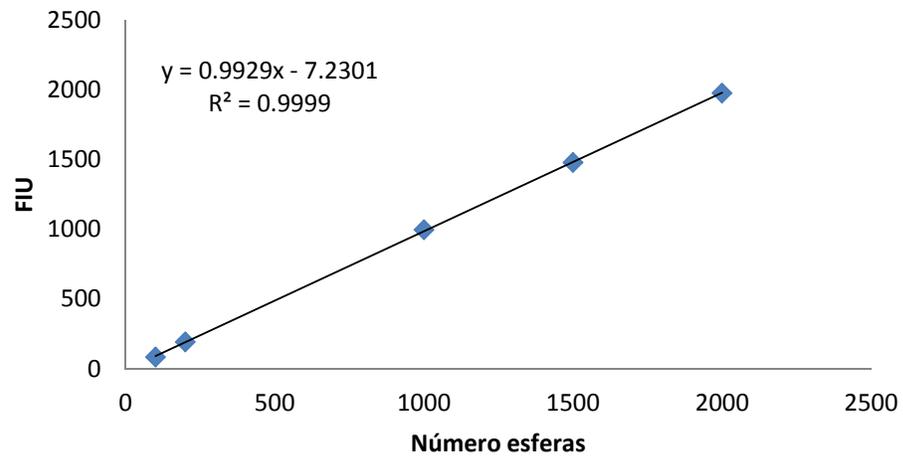


Figura 27. Curva de calibración para determinar la cantidad de fluorescencia presente en las microesferas fluorescentes.